

Humanized green fluorescent protein genes and methods

Patent number: JP2000503536T

Publication date: 2000-03-28

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/48; C07K14/435;
C07K14/47; C07K19/00; C12N15/09; C12R1/91;
C12N5/10; C12P21/02; C12Q1/02

- european: C07K14/435A5; C12N15/87

Application number: JP19970526204T 19970117

Priority number(s): WO1997US00755 19970117; US19960588201
19960118

Also published as:



WO9726333 (A1)

EP0874903 (A1)

US5874304 (A1)

EP0874903 (B1)

AU730842 (B2)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2000503536T

Abstract of corresponding document: **US5874304**

Disclosed are synthetic and "humanized" versions of green fluorescent protein (GFP) genes adapted for high level expression in mammalian cells, especially those of human origin. Base substitutions are made in various codons in order to change the codon usage to one more appropriate for expression in mammalian cells. Recombinant vectors carrying such humanized genes are also disclosed. In addition, various methods for using the efficient expression of humanized GFP in mammalian cells and in animals are described.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

【物件名】

刊行物 6

【添付書類】

36  364

ଶିଖିତ

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2000-503536
(P2000-503536A)

(43) 公表日 平成12年3月28日(2000.3.28)

(51) Int.Cl.
C 12 N 15/09
C 07 K 14/435
14/47
19/00
C 12 N 5/10

識別記号
ZNA

F I
C 1 2 N 15/00
C 0 7 K 14/435
14/47
12/00

デーマコート^{（ダマコート）}

(21) 出願番号	特許平9-528204
(22) 出願日	平成9年1月17日(1997.1.17)
(36) 翻訳文提出日	平成10年7月17日(1998.7.17)
(36) 國際出願番号	PCT/US97/00755
(37) 國際公開番号	WO97/26333
(37) 國際公開日	平成9年7月24日(1997.7.24)
(31) 優先権主張番号	08/588,201
(32) 優先日	平成8年1月18日(1996.1.18)
(33) 優先権主張国	米国(US)

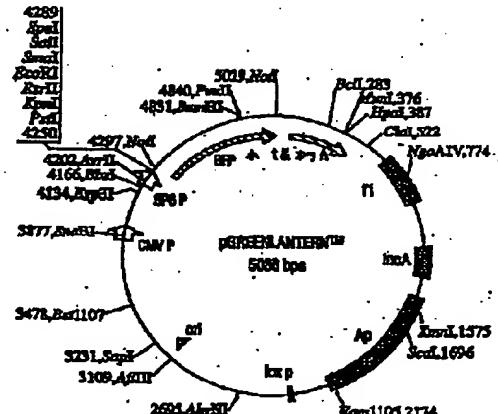
(71) 出願人 ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ ファウンデーション, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 フロリダ 32611, ゲインズビル, グリンター ホール 223
(72) 発明者 ソロツキン, セルゲイ
アメリカ合衆国 フロリダ 32608, ゲインズビル, エス.ダブリュー. 36ティーエイチ ストリート 3811-59
(74) 代理人 会澤士, 山本, 香櫻

最善の如く

(54) 【発明の名稱】 ヒト化グリーン蛍光タンパク質遺伝子および方法

(57) (559)

哺乳動物細胞特にヒト起源の細胞における高レベル発現に適合させた、合成および「ヒト化」型のグリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が開示される。塩基配換が、ニドンの使用を哺乳動物細胞における発現により1つ以上の適切な使用に変化させるために、種々のコドンにおいてなされる。このようなヒト化遺伝子を保有する組換えベクターが生た、開示される。さらに、哺乳動物細胞および動物におけるヒト化GFPの効果的な発現を用いるための種々の方法が整備される。



Page 10

〔特許権との競合〕

- ヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子。
- 前記遺伝子が、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードする。請求項 1 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記遺伝子が、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードし、65位のセリンをトレオニンに置換した。請求項 1 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記遺伝子が、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードする遺伝子であって、56位のチロシンをヒスチジンに置換した。請求項 1 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記遺伝子が、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードする遺伝子であって、54位と 65 との間の残基配列 Pro Ser Tyr Val Gly al Glu (配列番号 4) を配列 Met Gly Tyr Gly Val Leu (配列番号 5) に置換した。請求項 1 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記コドン位置の少なくとも約 10%がヒト化コドンを含む。請求項 1 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記コドン位置の少なくとも約 15%がヒト化コドンを含む。請求項 6 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記コドン位置の少なくとも約 20%がヒト化コドンを含む。請求項 7 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記コドン位置の少なくとも約 35%がヒト化コドンを含む。請求項 8 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記コドン位置の少なくとも約 50%がヒト化コドンを含む。請求項 9 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記コドン位置の少なくとも約 60%がヒト化コドンを含む。請求項 10 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記コドン位置の少なくとも約 70%がヒト化コドンを含む。請求項 11 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。
- 前記コドン位置の少なくとも約 80%がヒト化コドンを含む。請求項 12 に記載のヒト化 GFP 遺伝子。

3. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 93, 125, 150, 178, 195, 204, 235、および241に位置する10個のコドンからの少なくとも7個のヒト化コドンを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

4. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 93, 125, 150, 178, 195, 204, 235、および241に位置する10個のコドンからの少なくとも8個のヒト化コドンを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

5. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 93, 125, 150, 178, 195, 204, 235、および241に位置する10個のコドンからの少なくとも9個のヒト化コドンを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

6. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 93, 125, 150, 178, 195, 204, 235、および241の各々で1個のヒト化コドンを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

7. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 125, 178, 195、および235でヒト化ロイシンコドンCTG, CTG、またはCTTのいずれか1つを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

8. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 150、および241でヒト化バリンコドンCTGを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

9. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置235でヒト化セリンコドンCTTを含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

10. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数の増加した数のGCTまたはGCGアラニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

11. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のGCTアスパラギンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

12. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のGCTアスパラギンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

3. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のGTCグリグリダミン複コードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

2. 4. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のTTCフェニルアラニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

2. 5. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のGCGグリシンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

2. 6. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のGACヒスチジンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

2. 7. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のGTCイソロイシンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

2. 8. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のAGCアラニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

2. 9. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のGTTまたはTTCロイシンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

3. 0. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のGCAまたはGCGアラニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

3. 1. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のGCTまたはGATプロリシンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

3. 2. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加し

3. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のCTG、CTC、またはTTCアルギニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

3.3. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のCTGまたはTTCセリンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

3.4. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のCTGまたはTTCトレオニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

3.5. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のCTGトレオニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

3.6. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のCTGまたはCTTアラニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

3.7. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、増加した数のTTCチロシンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

3.8. 前記遺伝子が、TCA終止コドンを含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

3.9. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、減少した数のCTAアラニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

4.0. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、減少した数のCTGアラニンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

4.1. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、減少した数のCTT、CTA、またはTTCチロシンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化CFP遺伝子。

4.2. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、減少した数のALUアルギンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

4.3. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、減少した数のGAT、TAA、またはTGGセリンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

4.4. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して、減少した数のATまたはTAAリシンコードコドンをコード領域内に含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

4.5. 前記遺伝子が、Kozakコンセンサス配列の下流に作動可能に位置する、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

4.6. 前記遺伝子が、配列番号3の挿入配列を含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

4.7. 前記遺伝子が、タンパク質コード領域配列に作動可能に連結する、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

4.8. 前記遺伝子が、哺乳動物細胞において操作的なプロモーターの転写開始下に位置する、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

4.9. 前記発現ベクターとしてさらに規定される、請求項4.8に記載のヒト化GFP遺伝子。

5.0. プロモーターの下流に作動可能に位置するヒト化GFPレポーター遺伝子を含む、該プロモーターが哺乳動物細胞においてヒト化GFP遺伝子の発現を抑制する、発現ベクター。

5.1. 前記プロモーターが調節プロモーターである、請求項5.0に記載の発現ベクター。

5.2. 前記プロモーターがウイルスプロモーターである、請求項5.0に記載の発現ベクター。

5.3. 前記プロモーターが、BSV、TL、BSV、SV40、CMV、またはタクテウスプロモーターである、請求項5.0に記載の発現ベクター。

ートに対する耐性を有する、請求項6.3に記載の発現ベクター。

6.6. 前記発現ベクターが、ボリアデニル化シグナルをさらに含む、請求項5.0に記載の発現ベクター。

6.7. 前記発現ベクターが、組換えアテノウイルススペクターである、請求項5.0に記載の発現ベクター。

6.8. 前記発現ベクターが、組換えアデノウイルス(MAV)ベクターである、請求項5.0に記載の発現ベクター。

6.9. 前記発現ベクターが、組換えレトロウイルススペクターである、請求項5.0に記載の発現ベクター。

7.0. 前記発現ベクターが、配列番号3の挿入配列を有するヒト化GFPレポーター遺伝子を含む、請求項5.0に記載の発現ベクター。

7.1. 前記発現ベクターが、増強されたグリーンまたは増強されたブルー蛍光タンパク質を発現する、請求項5.0に記載の発現ベクター。

7.2. ヒト化GFP遺伝子を含む、組換え宿主細胞。

7.3. 前記ヒト化GFP遺伝子が、組換えベクターを用いて前記細胞に導入される、請求項7.2に記載の組換え宿主細胞。

7.4. 前記細胞が、前記ヒト化GFP遺伝子を発現し、コードGFPタンパク質を產生する、請求項7.3に記載の組換え宿主細胞。

7.5. 前記細胞が、哺乳動物細胞である、請求項7.2に記載の組換え宿主細胞。

7.6. 前記細胞が、ヒト細胞である、請求項7.2に記載の組換え宿主細胞。

7.7. 前記細胞が、Vero、HeLa、CHO、COS、V138、BSR、RipC2、Xli、K12、MDCK、A549、PC12、ES21、または293細胞である、請求項7.2に記載の組換え宿主細胞。

7.8. 前記細胞が、一次細胞株の細胞である、請求項7.2に記載の組換え宿主細胞。

7.9. 前記細胞が、哺乳動物細胞内に収集される、請求項7.2に記載の組換え宿主細胞。

8.0. 前記細胞が、配列番号3の挿入配列を含むヒト化GFP遺伝子を含む、請求

5.4. 前記プロモーターがDOPプロモーターである、請求項5.3に記載の発現ベクター。

5.5. 前記プロモーターが、誘導プロモーターである、請求項5.0に記載の発現ベクター。

5.6. 前記プロモーターが、チトクロムP450、熱ショックタンパク質、メクロチオネインまたはエストロゲン遺伝子プロモーター、放射線誘導(radiation-inducible)プロモーター、またはtelIVIPプロモーターである、請求項5.5に記載の発現ベクター。

5.7. 前記プロモーターが、組換え型のプロモーターである、請求項5.0に記載の発現ベクター。

5.8. 前記プロモーターが、FAB、インスリン、トランスフィレチン、α1-抗トリプシン、PAI-1、アボリボタンパク質A1、IL-1レセプター、VGP、GAP、OP50、または前記遺伝子プロモーターである、請求項5.7に記載の発現ベクター。

5.9. 前記発現ベクターが、組換えのクローニング部位をさらに含む、請求項5.0に記載の発現ベクター。

6.0. 前記発現ベクターが、後記プロモーターと前記ヒト化GFP遺伝子との間に作動可能に位置された組換えのクローニング部位を含む、請求項5.9に記載の発現ベクター。

6.1. 前記発現ベクターが、前記ヒト化GFP遺伝子の下流に作動可能に位置された組換えのクローニング部位を含む、請求項5.9に記載の発現ベクター。

6.2. 前記発現ベクターが、組換えエレメントをさらに含む、請求項5.0に記載の発現ベクター。

6.3. 前記発現ベクターが、第2レポーター遺伝子をさらに含む、請求項5.0に記載の発現ベクター。

6.4. 前記第2レポーター遺伝子が、第2転写単位内に含まれる、請求項5.3に記載の発現ベクター。

6.5. 前記第2レポーター遺伝子が、ネオマイシン、ヒグロマイシン、ビュロマイシン、ゼオシン、ミコフェノール酸、ヒスチジノール、またはメトトレキセ

項7.2に記載の組換え宿主細胞。

8.1. 前記細胞が、所定のタンパク質を発現する組換え遺伝子をさらに含む、請求項7.2に記載の組換え宿主細胞。

8.2. 適切な導入手段にて、ヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを含む、レポーター遺伝子発現キット。

8.3. 哺乳動物細胞を標識するための方法であって、ヒト化GFP遺伝子を該細胞において発現する工程を含むする、方法。

8.4. 細胞の集団内の哺乳動物細胞を同定するための方法であって、以下の工程：

(a) 評価池において、ヒト化GFP遺伝子を発現する工程；
(b) GFPを発現しない細胞の集団と該集団を組合する工程；および
(c) GFP発光強度を同定することによって該集団を同定する工程。

を包含する、方法。

8.5. 外因性DNAセグメントを含む哺乳動物細胞を同定する方法であって、以下の工程：

(a) 外因性DNAセグメントに作動可能に連結されるヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを、該細胞に導入する工程；および
(b) GFP発光強度を同定することによって、該外因性DNAセグメントを含む細胞を同定する工程。

を包含する、方法。

8.6. 前記発現ベクターが、DOPをコードする第1コード領域および前記外因性DNAセグメントを含む第2コード領域を含む、請求項8.5に記載の方法。

8.7. 前記外因性DNAセグメントが、非組成物をコードする、請求項8.5に記載の方法。

8.8. 前記外因性DNAセグメントが、選択されたタンパク質またはペプチドをコードする、請求項8.5に記載の方法。

8.9. 前記発現ベクターが、前記選択されたタンパク質またはペプチドに作動可能に連結されたGFPを含む融合タンパク質をコードする第1コード領域を含む、

請求項8-8に記載の方法。

9-0. 前記融合タンパク質が、宿主下の発生化シグナルを含むペプチドに作用可能な変異されたGFPを含む、請求項8-9に記載の方法。

9-1. 前記融合タンパク質が、宿主下の発生化シグナルを含む変異されたタンパク質およびペプチドに作用可能な連結されたGFPを含む、請求項9-0に記載の方法。

9-2. 前記融合タンパク質が、核酸的化ペプチドに連結されたGFPを含む、請求項9-0に記載の方法。

9-3. 前記融合タンパク質が、ミトコンドリア核酸的化ペプチドに連結されたGFPを含む、請求項9-0に記載の方法。

9-4. 前記細胞が、異なるスペクトル特性を有するGFPタンパク質を各々発現する、第1および第2ヒト化GFP遺伝子を含む、請求項8-5に記載の方法。

9-5. 前記細胞が、ヒト細胞である、請求項8-5に記載の方法。

9-6. 前記GFP蛍光細胞が、蛍光活性化セルソーティングによって固定される、請求項8-5に記載の方法。

9-7. 前記細胞が、哺乳動物内に位置する、請求項8-5に記載の方法。

9-8. 哺乳動物細胞内の連結されたタンパク質の位置を検出するための方法であつて、以下の工程：

(a) 連結されたタンパク質をコードする遺伝子に作用可能な連結されたヒト化GFP遺伝子を含む連結したGFP配列を含む発現ベクターを、該細胞に導入する工程；および

(b) GFP蛍光の位置を検定することにより該細胞内の連結されたタンパク質の位置を固定する工程。

を包含する、方法。

9-9. 前記細胞の前記連結されたタンパク質の前記位置が、外部測定に依存する、請求項9-6に記載の方法。

1-0-0. 前記細胞内の前記連結されたタンパク質の前記位置が、細胞周期に依存

する、請求項8-8に記載の方法。

1-0-1. 哺乳動物細胞内の発現されたタンパク質を核酸的化する方法であつて、以下の工程：

(a) ヒト化GFP遺伝子およびタンパク質コード遺伝子に作用可能な変異された核酸的化ペプチドをコードする配列を含む連結したGFP配列を含む発現ベクターを、該細胞に導入する工程；および

(b) GFP蛍光の位置を同定することにより、該細胞内の該タンパク質の該連結された位置を確認する工程。

を包含する、方法。

1-0-2. 哺乳動物細胞における該プロモーターを試験する方法であつて、以下の工程：

(a) 試験プロモーターの削除下でヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを、該細胞に導入する工程；

(b) 試験プロモーターによって該ヒト化GFP遺伝子の発現を可能にするのに必要な条件下および十分な時間、該細胞を維持する工程；および

(c) GFP蛍光細胞を同定する工程であつて、GFP蛍光細胞の存在が、活性プロモーターを示す、工程。

を包含する、方法。

1-0-3. 前記試験プロモーターが、核酸的組成脊椎的プロモーターである、請求項1-0-2に記載の方法。

1-0-4. 前記試験プロモーターが、候補的試験プロモーターである、請求項1-0-2に記載の方法。

1-0-5. 前記試験プロモーターが、哺乳動物細胞における発現について試験されら候補的遺伝子と天然に合致する、請求項1-0-2に記載の方法。

1-0-6. 前記細胞が、哺乳動物内に位置する、請求項1-0-2に記載の方法。

1-0-7. 哺乳動物細胞において、連結されたプロモーターからの発現を制御する物質を挿入する方法であつて、以下の工程：

(d) 連結されたプロモーターの削除下で、ヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクタ

一を、哺乳動物細胞に導入する工程；

(b) 該物質を含むと思われる組成物を、該細胞に導入する工程；および

(c) GFP蛍光位置を同定する工程であつて、GFP蛍光細胞の存在が、該連結されたプロモーターからの発現を制御する物質の存在を示す、工程。

を包含する、方法。

1-0-8. 前記細胞が、導入された汚染細胞である、請求項1-0-7に記載の方法。

1-0-9. 哺乳動物において、連結された遺伝子の発現レベルを検定するための方法であつて、以下の工程：

(a) 連結された遺伝子に作用可能な連結されたヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを、該哺乳動物の細胞において発現する工程；および

(b) 該哺乳動物の細胞において、GFP蛍光のレベルが、該連結された遺伝子の発現レベルを示す、工程。

を包含する、方法。

1-1-0. 哺乳動物の異なる組織における連結された遺伝子の発現を分析するための方法であつて、以下の工程：

(a) 天然の遺伝子プロモーターの削除下で該連結された遺伝子を含む発現ベクターを、該哺乳動物の細胞に導入する工程であつて、該遺伝子は、ヒト化GFP遺伝子に作用可能に連結した、工程；

(b) 該遺伝子の発現を可能にするために動的的な条件下および十分な時間、該

乳動物を維持する工程；および

(c) 該哺乳動物の組織の細胞を分析する工程であつて、所与の組織におけるGFP蛍光細胞の存在が、該組織における遺伝子発現を示す、工程。

を包含する、方法。

1-1-1. ヒト化GFP遺伝子を用いる方法であつて、哺乳動物寄主細胞においてヒト化GFP遺伝子を発現する工程、および該細胞によって発現されるGFPを回収する工程を包含する、方法。

1-1-2. 前記ヒト化GFP遺伝子が、更知の分子量のタンパク質またはペプチドをコードするGFP配列と融合し、そしてここで前記寄主細胞が、GFP融合タンパク質

を発現する、請求項1-1-1に記載の方法。

1-1-3. 前記遺伝子が、145位のチロシンがフェニルアラニンで置換された配列番号2のアミノ酸配列を有するブルー蛍光タンパク質をコードする、請求項4に記載のヒト化GFP遺伝子。

1-1-4. 配列番号2のアミノ酸配列の5位のチロシンをコードするTATが、CATで置換され、そして配列番号2のアミノ酸の145位のチロシンをコードするTATが、TTCで置換されている、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

1-1-5. 前記遺伝子が、64位のフェニルアラニンがロイシンで置換され、そして65位のセリンがトレオニンで置換された配列番号2のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードする、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

1-1-6. 配列番号2のアミノ酸配列の64位のフェニルアラニンをコードするTTCが、CTCで置換され、そして65位のセリンをコードするTCTが、CTGで置換されている、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

【発明の詳細な説明】

ヒト化グリーン蛍光タンパク質遺伝子および方法

発明の章

1. 発明の分野

本発明は、一般に、レポーター遺伝子の分野に関し、特に改善されたグリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子、供給物、および使用方法を提供する。本明細書中に掲示される GFP 遺伝子は、好ましい配列コドンを用いることにより、哺乳動物およびヒト細胞における発現のために適合されたヒト化 GFP 遺伝子である。

2. 製造伝統の説明

レポーター分子は、遺伝子実現をモニターするために、生物活性な系において頻繁に使用される。一般的に使用されるレポーター遺伝子としては、ルガクトリシゲーテ、ホタルシフェラーゼ、アルカリニスフターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) およびβ-グルコニダーゼ (GUS) が挙げられる。しかし、利用可能なレポーター遺伝子は、それらの使用を制限する特徴的の欠点を有する。頻繁に挙げられる欠点は、マトリックスの導入が必要とされることである。他の欠点としては、例えば、特定のタンパク質の大さきが挙げられ、これはレポーター・融合タンパク質の発現が困難であり得ることを意味する。

別の有効なストラテジーは、タンパク質を蛍光タグで標識して、インクタクトな細胞におけるその後の挿出および同化を可能にすることである。蛍光標識は、免疫蛍光および蛍光ナラログ標識化などとともに使用され、ここで、タンパク質の生化学およびトラッキングが、生存細胞中のマイクロインジェクションの後にモニターされる。

蛍光標識は一般に、タンパク質を特異的、そしてそれを有する性質の反応性酵素体に共有結合することにより達成されている。これらの方針において、色素系着色の化学量論および位置はしばしば制御するが困難であり、そしてタンパク質の生化学的性質が通常必要である。さらなる問題は、標識タンパク質を細胞中へ導入することである。これは、タンパク質を細胞質膜を通して導入する

ために、マイクロインジェクション技術または細胞透過程化の方法を含む。

蛍光タグ化タンパク質に対する分子生物学的代替物は、最近の進歩およびグリーン蛍光タンパク質 (GFP) のクローニングにより可能となった。クラゲ *Aequorea victoria* 由来の GFP は、遺伝子によりコードされるグリーン蛍光タンパク質 (GFP) は、青色光 (395 nm で主要ピーク) を吸収し、そして緑色光 (508 nm で主要ピーク) を発する。238 アミノ酸のタンパク質である (*Morin* らよし *Matz* ら, 1991; *Ward* ら, 1990; *Prasher* ら, 1992)。GFP はキサベプチド染色法はアミノ酸 64 においてあり、そして、このヘキサペプチド内のセリン・デヒドロチロシン・グリシンの置換を介して一次アミノ酸配列から翻訳される (*Suzumura* ら, 1979; *Odaira* ら, 1993)。

光活性性および蛍光性、遺伝子性であり、そしていかなる遺伝子でも、マトリックスも、*A. victoria* 由来のさらなる遺伝子を必要としない (*Dulleck* ら, 1994)。このことは、有意義な遺伝子発現が達成される限り、*A. victoria* 以外の生物細胞における GFP の検出を可能にする。従って、GFP の小さな大きさおよび他の「リアルタイム」の検出は、GFP をレポーター遺伝子としての使用のための有望な手段にする。

改善されたスペクトル特性を有する特定の GFP 改良体が、最近報告されている。

例えば、*Heim* ら (1994) は、青色蛍光を発し、そして GFP のかわりにヒスチジンを含む改良体を記載した。*Heim* ら (1995) は後に、*Renilla luciferase* のスペクトルにずっとより近いスペクトルを有する Ser65-to-Thr GFP 改良体を記載した。これは、*Aequorea GFP* の、より長波長のピークの 1 モノマー当たりの蛍光強度の 10 倍より大きい 1 モノマー当たりの蛍光強度を有する。

しかし、特定の需要にもかかわらず (例えば、上記の改変体)、GFP の現在の有用性は、哺乳動物細胞における効率的、よくても低い発現レベルにより、なされ難い。それゆえ、GFP 標識における新たな問題が、このタンパク質の完全な活性が理解される前に、特に、哺乳動物細胞における発現を必要とする適用 (遺伝子治療ストラテジーを含む)において、必要であることは明らかである。

ある。

発明の範囲

本発明は、花咲技術に関するこれらおよびその他の欠点を、哺乳動物およびヒト細胞における発現のために適合されたヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を提供することにより、克服しようとする。本発明のヒト化 GFP 遺伝子は、ヒト遺伝子における使用のために好ましいコドンを DNA 配列中に組み込むことにより調整される。ヒト化 GFP 発現供給体ならびにヒト化遺伝子およびベクターの種々の使用方法もまた提供される。

従って、本発明は、ヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子ならびにそのような遺伝子の作製および使用の方法を提供する。本明細書中で使用される用語「ヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子」は、少なくとも 1 つ、そして好ましくは 1 つを越える、そして最も好ましくは有意味な数のラゲッジのコドンを、ヒト遺伝子においてより頻繁に使用される 1 つ以上のコドンで置換することにより、哺乳動物またはヒト細胞における発現のために適合された遺伝子を意味する。

本発明のヒト化遺伝子は好ましくは 1 つであるが、ゲノムコピーは決して除外されない。ヒト化遺伝子はまた、好ましくは、*A. victoria* GFP 遺伝子から適合されたヒト化遺伝子であるが、他の GFP 遺伝子供給源もまた、除外されない。

特定期の実施態様において、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードするヒト化 GFP 遺伝子を提供する。

他の実施態様において、ヒト化 GFP 遺伝子は、おおむね自己の配列に基づくが、特定期の変更を有する GFP 改良体をコードする。特定期の例は、65 位のセリンがスレオニンで置換された配列番号 2 のアミノ酸配列を有する GFP をコードするヒト化遺伝子である。

さらなる例は、65 位のチロシンがヒスチジンで置換された配列番号 2 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードするヒト化 GFP 遺伝子である。

別の例は、64 位と 65 位との間の発色團配列即ち Ser-Tyr-Gly-Tyr-Gly (配列番号 4) が配列 Ser-Gly-Tyr-Gly-Tyr-Gly (配列番号 5) で置換された配列番号 2

のアミノ酸配列を有する GFP をコードするヒト化 GFP 遺伝子である。

ヒト化市販遺伝子の既存の等価物もまた、本発明に含まれる。しかし、アミノ酸配列における 1 つ以上のアミノ酸置換、またはカルボキシル末端からの約 10 もしくは 15 アミノ酸残基で標識化された改良体は、蛍光タンパク質の產生に関しては一般に有用であるとは考えられない。それゆえ、コードされる GFP は、最小で約 22 アミノ酸長であるべきであり、約 28 アミノ酸長のタンパク質が一般に好ましい。

本発明のヒト化遺伝子はまた、少なくとも約 10% のそのコドン位置がヒト化コドンを含む遺伝子によりたたずめられる。すなわち、それらは、ヒト遺伝子において通常には使用されないコドンのかわりに、ヒト遺伝子において優先的に使用されるコドンを含む。

他の実施態様において、ヒト化遺伝子は、少なくとも約 15%、約 20%、約 25%、約 30% または約 35% のヒト化コドンの存在により標識されるコドン位置を有する。

少なくとも約 50% またはそれより多くのコドン位置がヒト化コドンを含むヒト化 GFP 遺伝子もまた本願される。

本発明の好ましいヒト化 GFP 遺伝子は、特定期の変化 (key change) を含む遺伝子である。例は、クラゲ GFP 遺伝子のコドン位置 1, 51, 53, 125, 150, 178, 201, 235、および 241 に位置する 10 のコドンから、少なくとも 8、少なくとも 9、または 10 のヒト化コドンを含む。

そのような供給物は、ヒト化ロイシンコドン (TC)、または TTG のいずれか 1 つを、GFP 遺伝子配列のコドン位置 1, 51, 125, 178, 195, 201, 236、および 241 においてヒト化遺伝子により置換される。さらなる例は、ヒト化バリンコドン (TG) を、GFP 遺伝子配列のコドン位置 1, 51、および 241 において含むヒト化 GFP 遺伝子である。他の例は、ヒト化セリンコドン (CT) を、GFP 遺伝子配列のコドン位置 20 において含むヒト化遺伝子である。

本発明により包含されるヒト化αBt遺伝子はまた、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列に比較して増加した数のGCTまたはGCTアラニンコードコドンを含む遺伝子を含む。

用語「配列番号1の野生型クラゲ達子配列に比較して増加した数のコンドン」は、ヒト配列群、配列番号1の野生型クラゲ達子配列のコード領域内に存在する同じアミノ酸をコードするコンドンに比較して、配列番号2のアミノ配列、または本明細書中に記載の改変体もしくはその他の等価物の1つをコードする群のコード領域内の特定のアミノ酸をコードする、増加した数のコンドンを含むことを意味する。従って、用語「増加した」が、この関連で括弧される場合、コード領域の末端部分への1つ以上のコンドンの付加を意味するのではなく、むしろコード領域内の所持しないコンドンのヒトまたは培養細胞細胞における数試験のためによく使われるコンドンでの量産を意味することが理解される。

上記の定義に照らして、本発明のヒト化IgG1遺伝子はまた、配列番号1の野生型ケグラ遺伝子配列に比較して、増加した数のTACシステインコードコドン；増加した数のGAGアスパラギン酸コードコドン；増加した数のGCGグルタミン酸コードコドン；増加した数のTCTフェニルアラニンコードコドン；増加した数のGCGグリシンコードコドン；増加した数のGAGヒスチジンコードコドン；増加した数のGATイソロイシンコードコドン；増加した数のAGCアラジンコードコドン；増加した数のGTCロイシンコードコドン；増加した数のGACアスパラギンコードコドン；増加した数のGTCもしくはGTTブロリンコードコドン；増加した数のGAGグルタミンコードコドン；増加した数のGCA、GAAもしくはGATアルギニンコードコドン；増加した数のGTCもしくはTCTセリンコードコドン；増加した数のGACスレオニンコードコドン；増加した数のGCAもしくはGTCアラジンコードコドン；および/または増加した数のTACチロシンコードコドンを含む遺伝子として定義される。

特定の実施選択において、ヒト化された遺伝子はまた、TGA終止コドンを含み得る。

ヒト化 α 選伝子はまた、配列番号1の野生型クラゲ選伝子配列に比較して、減少した数の特定のコドンを含むことにより定義され得る。この両連での「減少

した」もまた、ヒト化配列が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列のコード領域

域内に存在する同じアミノ酸をコードするコドンに比較して、アリパロツ 2 のアミノ酸配列、またはその変換操作しくは等価物をコードする GFP コード領域内の特定のアミノ酸をコードする、減少した数のコドンを含むことを意味する。はって「減少した」が、いかようにも、コード領域の仕事の部分からのコドンの削除か欠失を意味するのではなく、むろアラゴン酸のコドン直前子においてより結果に生じるコドンでの置換をいうことが実際される。

従って、本発明のヒト化gDNA遺伝子はまた、減少した数のGCAアラニンコードドコンドン；減少した数のGCGグリシンコードドコンドン；減少した数のCTT；CTTもしくはTAAイソイシンコードドコンドン；減少した数のGAGアルギニンコードドコンドン；減少した数のAST；TCAもしくはTCGセレンコードドコンドン；または減少した数のGTTもしくはGTAバリンコードドコンドンを含む遺伝子として定義される。

必要とされるとは考えられてはいないが、ヒト化DNA産生子が、ヒト化遺伝子配列の上流に作用可能な配列されたpromoterコンセンサス配列を含む（すなわち、遺伝子がpromoterコンセンサス配列の下流に配置される）ことが望む好ましい。

特許の好ましいヒト化IgG遺伝子は、既に図9の複数配列を含む。しかし、これは決して既定ではなく、そして本発明のまさに1つの示例的な実施形態である。多くの他のそのようなヒト化IgG遺伝子をいかにして作製および使用するかについての詳細な指図は、本明細書中に含まれている。例えば、多段の透析などをIgG遺伝子のいずれか1つを作製するにあたり、表2、表3、および表4中の情報を参考されよう。

本実用の様式においてヒト化された遺伝子はまた、他のタンパク質共一樣に被膜配列に作用可能に変換され得る。これは一般に、そのような被膜構成物の発現後には、融合タンパク質の産生を生じる。N末端およびC末端の両方の融合タンパク質が生成される。

実質的に任意のタンパク質もしくはペプチドコード下限配列、またはその組み合わせが、融合タンパク質をコードするためにヒト化され配列に組合せられる。これは、標的化ペプチド、合衆的タンパク質、組織え免疫のためのタンパク質、

1つ以上の標的化ペプチドが付与されたタンパク質、タンパク質サブユニットなどをコードする酵素配列を含む。

組換えベクターおよびプラスミドは、本発明の創の重要な項目を形成する。そのようなベクターにおいて、ヒト化HIF遺伝子は、プロモーター（一般に、哺乳動物またはヒト腎臓において作用可逆であるプロモーター）の転写制御下に配置される。「転写制御下に配置される」は、ヒト化HIF構成が、プロモーターの下流にしてして転写制御下に配置され、その結果、そのプロモーターが、哺乳動物またはヒト腎臓細胞におけるHIF-1タンパク質の発現を、ベクターのそのような組成中の導入と一致して、局向きさせ得ることを意味する。

使って、本兎男の植え抜きベクターは一並に、プロモーターの下流に作物可変性配列されたヒト化ガレーボーター選択子を含む。ここで、プロモーターは、哺乳動物またはヒト細胞におけるヒト化ガレーボーターの発現を指向させ得る。好ましくは、プロモーターは、細胞におけるGFPの発現域にグリニン選択子を挿入することによるGFPの発現を可能にする十分量のGFPの発現域を指向させる。競って、そのようなプロモーターは、哺乳動物およびヒト細胞において「作物可変性」である。

本発明による発光ペクターおよびプラスミドは、1つ以上の純活性プロモーター（例えば、転写を促進することにおいて一般に活性である、ウイルスプロモーターまたは哺乳類遺伝子由來のプロモーター）を含み得る。純活性ウイルスプロモーターの例としては、CMV、IE、HSV、SV40、およびロボプロモーターが挙げられる。この中で、CMVプロモーターが現在好ましい例である。現在在販用例等のプロモーターの例としては、 β アクチノペロモーターにより証明されるような例のハラスモーディファインドプロモーターが挙げられる。

誘導性プロモーターおよび／または構築エレメントもまた、本発明の発現ベクターとの使用のために企図される。適切な誘導性プロモーターの例としては、例えば、チトクロムP450還元酵素、熱ショックタンパク質伝達子、メタリオチオキサン伝達子、ホルモン誘導性伝達子（例えば、エストロゲン伝達子プロモーター）などの現存する山手のプロモーターが挙げられる。黒質細胞への導入には、たとえば、

活性化されるプロモーター（例えば、*lac*, *lacZ*, および*trc*-*l*）もまた検出される。テトラサイクリンに応答性である*tet*プロモーターが現在好ましい例である。

組織特異的プロモーターおよび/または調節エレメントは、特定の実施結果において有用である。本発明の発明ベクターと使用されるそのようなプロモーター

一の例としては、肝臓細胞膜結合（GDP）タンパク質遺伝子（結晶上皮に特異的）；インスリン遺伝子（胰島細胞に特異的）；トランスフィレチン（transferrin）；α-1-アンチトリプシン、プラスミノーゲン活性化因子インヒビター型（PAI-1）；アボリプロテインE（および血漿レセプター遺伝子（肝臓細胞に特異的）；ミエリン酸基化タンパク質（GDP）遺伝子（走行部神経細胞に特異的）；グリセロ糖基化タンパク質（GDP）遺伝子（神經細胞に特異的）；GPTK（尿への導出化に特異的）などならびに神經細胞に特異的である神經特異的エノラーゼ（GPTK）プロモーターが挙げられる。

免責ベクターおよびプラスミドの構造および使用は、当東者に周知である。従って、実質的に任意の哺乳動物細胞培養ベクターが、本明細書に開示されるにトキ遺伝子に適用して構成される。

所らしいベクターおよびプラスミドは、少なくとも1つのマルチクローニング部位を有して構築される。導入の実施装置において、受容ベクターは、プロモーターとヒト化HIV重複子配列との間に作用可能な配置されたマルチクローニング部位を含む。そのようなベクターは、他の実施装置におけるそれらの使用に加えて、第2のタンパク質コード配列を含めます。それがヒト化HIV重複子構成的かつコンフィグレーションであるように、マルチクローニング部位中にクローニ化することにより、N末端融合タンパク質を作製するために使用される器。

他の実験結果において、発展ベクターは、発現可説ヒト化cDNA配列のF端に作用可説に配列されたマルチクローニング部を含み得る。これらのベクターは、それらの配列に加えて、第2のテンパク質コード四回スクレミメントを、それがヒト化cDNA配列と連結的かリンクフレームであるように、マルチクローニングベクターにクリップすることにより、その結果でテンパク質を合成することに

いて有用である。

その中に第2のタンパク質またはGFPコード装置セグメントもまた存在するベクターおよびプラスミドはまた、もちろん、核酸セグメントそれ自身の性質にかかわらず、本発明により包含される。

第2のレポーター遺伝子が、本発明の発現ベクター内に含まれる。第2のレポーター遺伝子は、第2の遺伝子単位内に含まれる。適切な第2のレポーター遺伝子としては、キオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ゼオシン (zeocin)、ミコフェノール酸、ヒスチジノールおよびストレモセートのような薬剤に対する耐性を有する遺伝子が挙げられる。

発現ベクターはまた、DNAエレメント、ポリアデノリ化シグナル、スプライスドナーノスプライスアクセソーラー・シグナルなどのような他の核酸配列を含み得る。

適切な発現ベクターの特定の例は、組換えアデノウイルス、組換えアデノ細胞ウイルス (AAV)、または組換えレトロウイルス系を使用する発現に適合されたベクターである。とりわけ、ワクシニアウイルス、單純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、および歎息性細胞炎ウイルスもまた使用される。

特定の実施形態において、発現ベクターまたはプラスミドは、配列番号3の核酸配列を有するヒト化GFPレポーター遺伝子を含み得る。

レポーター遺伝子発現キットもまた提供される。このキットは一概に、適切な宿主細胞中に、ヒト化GFP遺伝子を含む少なくとも1つの発現ベクターまたはプラスミドを含む。ベクターまたはプラスミドは一概に、哺乳動物またはヒト細胞における発現後のグリーン蛍光によるGFPの発現を可能にする十分な量のGFPを発現し得るベクターまたはプラスミドである。

組換え宿主細胞は、本発明の別の局面を形成する。そのような宿主細胞は一概に、少なくとも1コピーのヒト化GFP遺伝子を含む。発現目的のために好ましい細胞は、哺乳動物およびヒト細胞である。しかし、他の細胞が本発明の範囲から除外されないことが理解される。従って、細胞細胞、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、真菌細胞、および植物細胞のような細胞もまた可能であるが、その上

うな細胞は発現目的のためには好ましくない。

特定の実施形態において、組換え宿主細胞は好ましくは、細胞がGFPを、最も好ましくはGFPのその蛍光による検出を可能にする十分な量で、発現する。または発現するように制限されることを可能にするに有効な様式で、ヒト化GFP遺伝子を組み込む。従って、組換え宿主細胞は好ましくは、組換えベクターにより細胞中に導入されたヒト化GFP遺伝子を含む。

特定の実施形態において、組換え宿主細胞は、ヒト化GFP遺伝子を発現して、コードされるGFPタンパク質を、好ましくはGFPのその蛍光による検出を可能にするに十分な量で、産生する。約20コピーほど少しのヒト化GFP遺伝子を含む細胞が、しばしば、GFPのそのグリーン蛍光による検出を可能にするに十分な量で、GFPタンパク質を発現することが意図される。特定の実施形態において、約40コピー、約50コピー、またはたった約1もしくは2コピーほど少しのヒト化GFP遺伝子を含む細胞もまた、特にヒト化GFP遺伝子が改造体遺伝子である場合、所用される発現基準を満たしそうである。他の実施形態において、組換え宿主細胞は、約10時間の時間枠内、そして最も好ましくは約5時間以内、そして最も好ましくは約6時間枠内またはより短い時間以内で検出可能なGFPタンパク質を産生するために、ヒト化遺伝子を発現し得る。

適切な組換え宿主細胞の例としては、VSV細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター腎臓 (CHSE) 細胞株の細胞、CG4細胞 (例えば、DS-1)、ならびにDF1、BHK、B95a、JY、RJ、MDCK、M545、PC12、ES62、および293細胞が挙げられる。哺乳動物から細胞を取り出し、そして細胞を組みされた細胞培養した後に樹立された初代細胞株の細胞もまた、本発明の範囲内に含まれる。これらの細胞は、人の手により加工され、そしてそれがもともと採取された同じ宿主細胞に戻され得る。ヒト化GFP遺伝子を含むそのような細胞は、その位置にかかわらず、本発明の範囲内に入る。

当然、組換え細胞はまた、遺伝子治療により標的化され得たような、動物またはヒト被膜細胞の身体内に位置する細胞を含む。これらの細胞としては、遺伝子が獲得された様式 (例えば、トランسفエクション、感染などによる) にかかわらず、

す、少なくとも1コピーのヒト化GFP遺伝子またはベクターを含む全ての細胞が挙げられる。

脊髄の実施形態において、配列番号3の核酸配列を含むヒト化GFP遺伝子を含む組換え細胞が開拓される。

ヒト化GFP遺伝子を使用する多様な方法が、本発明により提供される。哺乳動物またはヒト細胞を、細胞内で少なくとも一つのヒト化GFP遺伝子を発現することにより標的またはタグ化する方法は、各方法の中心である。ヒト化GFP遺伝子は、好ましくは、GFP蛍光を検出することによる細胞内のGFPの存在を検出可能にするに十分な量のGFPを産生するはずである。

細胞の風呂内で哺乳動物またはヒト細胞を同定する方法もまた提供される。このような方法はまず、一般に、蛍光によるGFP蛍光を可能にするために十分な量のGFPを産生するために有効な様式で、細胞内で少なくとも一つのヒト化GFP遺伝子を発現する工程を含む。次いで、細胞はGFPを発現しない細胞の集団と混合されるか、または自身に混合され、別個のこの細胞が、GFP蛍光細胞を同定する手段により同定される。

本明細書中で使用される用語「GFP蛍光細胞」は、自身中のGFPからのグリーン蛍光を検出することによる細胞の基準的な検出を可能にするために十分な量のGFP蛍光の生じるために有効な様式でヒト化GFP遺伝子を発現する細胞を意味する。

本発明はさらに、外因性DNAセグメントを含む哺乳動物またはヒト細胞を同定するための方法を提供する。この方法はまず、一般に、外因性DNAセグメントに作用可能に連結されたヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを哺乳動物またはヒト細胞に導入する工程を含む。次いで、細胞は、グリーン蛍光によるGFP検出を可能にするために十分な量のGFPを産生するために、好ましくは、ヒト化GFP遺伝子の発現を可能にするに有効な条件下および期間で培養される。引き続いて、外因性DNAセグメントを含む細胞を組織的に同定することは、GFP蛍光細胞を同定することにより達成される。

これらの方針は、未標記細胞 (たとえば、アンチセンス核酸分子、リボソーム

、または他の染色体) をコードする外因性DNAセグメントを同定するために、および細胞細胞 (例えば、選択されるタンパク質またはペプチド) をコードする外因性DNAセグメントを同定するためにもまた有用である。

特定のこの実施形態において、このような方法での使用のための発現ベクターは、GFPをコードするヒト化GFP遺伝子として規定される第1のコード領域を含み、そしてまた外因性DNAセグメントを含む第2のコード領域を含む。これらのベクターは、一概に、少なくとも2つの転写ユニットまたは翻訳ユニットを含むベクターとして公知である。2つの転写ユニットは、それらのそれぞれの下流遺伝子の発現を指向する2つのプロモーターを天然に含む。

外因性DNAセグメントを含む哺乳動物またはヒト細胞を同定する方法はまた、

選択されるタンパク質またはペプチドに作用可能に連結されたGFPを含む融合タンパク質をコードする第1のコード領域を含む組換えベクター、用いる使用に適切である。このベクターは、選択されるタンパク質またはペプチドに作用可能に連結されたGFPを含む融合タンパク質を発現する。本発明のこれらの局面は、一般に、必ずしも特徴的ではないが、翻訳産物をコードする外因性DNAセグメントの検出を達成する。

このような様式で発現される融合タンパク質は、細胞下の (sub-cellular) 动化シグナル (例えば、調節的ペプチドまたはミトコンドリア標的化ペプチド) を含むペプチドに作用可能に連結されたGFPを含み得る。融合タンパク質はまた、細胞下の局在化シグナルを含む選択されるタンパク質およびペプチドの両方に作用可能に連結されたGFPを含み得る。

このような選択方法は、以下に記載されるような考慮において個々の目的でインピットロで実施される。これらの選択方法はまた、インピットで実施され得、ここで細胞は、哺乳動物またはヒト細胞体内に位置される。

2つ以上のヒト化GFP遺伝子 (各々が異なるスペクトル特性を有するGFPタンパク質を発現する) が、上記の様式で細胞内で検出される。1つ、2つ、またはそれ以上のいずれかのヒト化GFP遺伝子を発現するGFP蛍光細胞は、個々の方法によ向定され得、この方法は、胚発育過程および生光活性化セルソーティング (PL

(5) を含む。

本発明の方法のさらなる例は、哺乳動物細胞またはヒト細胞内の選択されるタンパク質の位置を決定するための方法である。これらの方法はまず、一般に、選択されるタンパク質をコードする遺伝子に作用可能に連結されたヒト化GFP遺伝子を含む遺伝子によってGFPを含む発現ベクターを細胞に導入する工程を包含する。このベクターは、一般に、選択されるタンパク質に作用可能に連結されたGFPを含む組合タンパク質を発現する。ここで、この組合タンパク質は、GFPのグリーン蛍光を検出することによる細胞の検出を可能にするために十分な量で產生される。次いで、GFPからのグリーン蛍光の位置を固定することにより、細胞内の選択されるタンパク質の位置が固定され得る。

これらの方法は、細胞内の選択されるタンパク質の位置を決定するために適切であり、ここで、この位置は、外部位置（例えば、筋、筋、筋、筋、またはカルモン、サイトカイン、神経伝導物質などのような個々のアゴニストの存在）に位置すると知られるかまたは考被される。これらの方法はまた、細胞内の選択されるタンパク質の位置を決定するために適切であり、ここで、この位置は、細胞膜における変化の間、細胞の老化的間、およびアボートシスなどの間に存在するような内部シグナルに依存すると知られるかまたは考被される。

本発明の方法のさらなる例は、タンパク質を哺乳動物またはヒト細胞内の選択される位置へ標識化するための方法である。これらの方法はまず、一般に、ヒト化GFP遺伝子の組合配列エレメントに作用可能に連結されてそれに連結する標識化ペプチド（これはまた、タンパク質をコードする組合配列エレメントに作用可能に連結されそれによってGFPを含む発現ベクターを細胞内に導入する工程を包含する。このようなベクターは、GFPおよびタンパク質に作用可能に連結された標識化ペプチドを含む組合タンパク質を発現する。ここで、この組合タンパク質は、GFP蛍光を検出することによって細胞の検出を可能にするために十分な量で細胞内に產生される。次いで、タンパク質は、細胞内の選択される位置に標識化され、そしてその位置が、グリーン蛍光の位置を校正することにより確定される。

本発明に同様する方法のさらなる例は、哺乳動物またはヒト細胞内の組合プロモーターを試験するための方法である。

これらの方法は、一般に、後述プロモーターの制御下でヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを細胞に導入する工程および後述プロモーターによるヒト化GFP遺伝子の発現を可能にするために有効な条件下および十分な期間で細胞を維持する工程を包含する。「有効な条件」および「十分な期間」は、後述の操作的なプロモーターを使用する場合に、グリーン蛍光によるGFP検出を可能にするために十分な量で產生されるGFPを過度生じるそれらの条件および時間として定義される。

適切な条件下細胞を維持した後、ついで、検査のGFP蛍光強度が固定される。ここで、GFP蛍光強度の存在は、固定される細胞内での発現構造物における活性プロモーターを示す。

これらの方法は、後述組合的的プロモーターを分析するため（ここで、このプロモーターは、哺乳動物またはヒト細胞の細胞内に試験される）；および後述の組合的プロモーターを分析するため（ここで、このプロモーターは、一般に、条件の範囲下で試験される）に適切である。本明細書中に使用される用語「組合的的プロモーター」は、特定の組合序で特徴的に遺伝子発現を指向するプロモーターおよび所定の組合中で遺伝子発現を優先的に指向するプロモーター（これはまた、「組合発現的」プロモーターと名付けられる）をいうために使用される。後述プロモーターはまた、哺乳動物またはヒト細胞内での発現のために試験される後述遺伝子と直接に結合するプロモーターであり得る。

これらの方法はさらに、インピトロおよびインピトプロモーターを分析するために適切である。ここで、後者の場合、細胞は、哺乳動物またはヒト細胞内に位置される。

プロモーターの文献において、ヒト化GFPを使用するための方法のさらなる例は、哺乳動物またはヒト細胞内の選択されるプロモーターからの転写を抑制する物質を検出するそれらの方法である。さらに、一般に、所定のプロモーターの制御下でヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターが、哺乳動物またはヒト細胞に導入

される。次いで、細胞が、所定のプロモーターからの転写を抑制しえることが知られるかまたは疑わしい物質を含むことが疑われる組合物に曝される。次いで、細胞は、活性プロモーターが、GFP由来グリーン蛍光を検出することによって細胞検出を可能にするために十分な量でGFP組合タンパク質を発現することを通過する間に、抑制または被抑制される。次いで、引き立つGFP蛍光強度の固定は、所定のプロモーターからの転写を抑制する物質の存在を示す。

これらの方法はまた、インピトロおよびインピトプロモーターの使用に適切である。インピトロでの使用は、毒物および抗原物質のような物質が、ヒト化GFP遺伝子組合物内での適切なプロモーターを使用することにより抽出されることを可能にする。

遺伝子活性の部分として、発現される哺乳動物またはヒト細胞内の遺伝子発現レベルを決定することがしばしば必要とされる。本発明はまた、このような発現レベルを決定するための方法を提供する。これらの方法は、一般に、選択される遺伝子に作用可能に連結されるヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを細胞の

細胞内に導入する工程を含む。発現ベクターは、好みしくは、GFP組合タンパク質を発現するベクター、またはヒト化GFP遺伝子および選択されるタンパク質遺伝子がそれぞれ同一または等価のプロモーターを使用するベクターのいずれかである。プロモーターは、好みしくは、インピトロでの検出を可能にするために十分なGFP発現を生じることが示されている。次いで、細胞の細胞内のGFP蛍光が決定され、ここで、GFP蛍光のレベルは細胞内における選択される遺伝子の発現レベルを示す。

これらの方法は、哺乳動物またはヒト細胞内での選択される遺伝子の発現を分析するための方法を提供するように説明される。このような方法は、一般に、天候の選択子プロモーターの制御下で選択される遺伝子（ここで、この遺伝子は、ヒト化GFP遺伝子に作用可能に連結される）を含む発現ベクターを哺乳動物の細胞内に導入する工程を包含する。ベクターは、好みしくは、GFPに作用可能に連結されたコード遺伝子を含む組合タンパク質を発現し、この組合タンパク質は、GFPのグリーン蛍光を検出することによる組合検出を可能に

するために十分な量で產生される。遺伝子の発現を可能にするために有効な条件下および十分な期間で哺乳動物を導入した後、次いで、哺乳動物の組織の細胞が、GFP蛍光強度を検出するため分離され、ここで、所定の組織内のGFP蛍光強度の存在は、組織内の遺伝子発現を示す。

ヒト化GFP遺伝子が使用されるさらなる例は、GFP自身の組換え牛である。ヒト化GFP遺伝子を使用するこのような方法は、既に、哺乳動物またはヒト細胞内でのヒト化GFP遺伝子を発現する工程およびその細胞により発現されるGFPを固定する工程を含む。

これらの方法は、以下の工程を含むように、より完全に記載される。

(a) ヒト化GFP遺伝子が哺乳動物またはヒト細胞内に操作的なプロモーターの制御下で位置される、組換えベクターを固定する工程；

(b) 組み換えベクターを哺乳動物またはヒト細胞内に導入する工程；

(c) コード化グリーン蛍光タンパク質（以下）の発現を可能にするために有効な条件下および十分な期間で組換え細胞を培養する工程；および

(d) その発現されたGFPを回収する工程。および、好みしくは、他の組換えタンパ

ク質の十分な量を有するGFPを複数する工程。

このような方法の組合せは、ヒト化GFP遺伝子が、公知の分子量のタンパク質またはペプチドをコードする調節剤と連結されることを含む。次いで、再生細胞による発現は、蛍光分子標識マーカーとして使用されるGFP組合タンパク質を生じる。このような蛍光分子標識マーカーの範囲は、分子量決定キットを使用するためにこのように定義される。

図版の図面の説明

以下の出図は、本発明の図面の部分を示し、そして本発明の特徴の範囲をさらに示すために含まれる。本発明は、本明細書中に提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせた一つ以上のこれらの図面を参照してより良好に理解され易る。

図1。gfp10由来のスクレオチド配列および指定アミノ酸配列。各コマンの上は、アミノ酸の一字表記である。gfp10配列内に導入された変異は、下のgfp10

の複数スクレオチドに示される。複数は、gfpとcDNAを含むするために使用されるオリゴスクレオチドを相互にプライムする延伸領域に下線を引く。オリゴスクレオチドの伸長される分を読み立てるために使用される制限酵素の部位は、太字で示される。Sergotin変異（より高い蛍光活性を生ずる）およびTyrosin変異（ブルー蛍光を生産する）を生産するために変異されるコドンは、太字で示される。図1において、クラゲgfpとスクレオチド配列に、配列番号1である。指定アミノ酸配列は、配列番号2である。配列番号3において、65位のTaaは、SerまたはThrであり得；そして65位のIaaは、TyrまたはTisであり得る。図1の下のgfpの複数スクレオチドに示される制限的なヒト化配列は、配列番号3である。配列番号3において、13S、15S、および17S位のアラニオチドが、上記のように、SerまたはTisのいずれか；およびTyrosinまたはTisのいずれかをコードするためには変化される。

図2Aおよび2Bベクタープラスミドの制限図。TAIプラスミドの構造物について図示するこれらの制限部位のみを示した。複数可能なエレメントおよびレポーター遺伝子カセットのサイズは、塩基対で示される。遺伝子および反ア

レメントの系統は、以下のようである：T12、T13-94 (Belanochinら、1989) 由来のpT12-βgal-β-フラゲメント (65位) + オリゴ 60、長160bpである；pT12は、G418耐性/初期のプロモーター/エンハンサーである；SD/34は、SV40原用ウイルスターンバック質量子由来のSV40スプライスドナーおよび受容体シグナルである；pT12-pT12内のVictoriaグリーン蛍光タンパク質由来、またはpT12-pT12内の化学合成されたヒト化gfpなどである；pT12またはpT12-pT12内のT12由来；またはpT12-pT12内のT13由来；pT12は、SV40グノム由来のSV40ボリアデニル化シグナルである；pT12は、オリオーマウイルス変異体T1741由来のエンハンサーの複数反応である；pT12は、T37のTKプロモーターである；neorは、T45由来のネオマイシン耐性遺伝子である；pT12は、pRC/CMV/neor由来のウシ成長ホルモボリアデニル化シグナルである；TDESは、SV40由来の1型ポリオウイルスの内部リボソーム挿入部位である (Dishkoff、1990)。

図2A. pT12-βgal-β-ベクターの構造。

図7. ヒト化gfpのブルー-βgal空具体の蛍光。293細胞は、pT12-pT12およびpT12-pT12で同時にトランスクレオチドされ、そしてトランスクレオチドの4日後には、Nikon Filter Cube T-20を使用して蛍光顕微鏡で撮影された。

図8. 蛍光顕微鏡で見られる変換EMSAの印の第一のブラーク。ブラークは、感染の即時時間に撮影された。

図9A、図9B、図9C、および図9D. rMAY-GFPg1で感染されたモルモットRETのセグメントにおけるGFP蛍光。図9A、細胞で見られる銀鏡近くの感染した底から上の底の部分を示す。図9Bは、銀鏡の上端近くの暗く着色した細胞の層は、むずかに傾斜した切片中のIEP帶である。光受容体細胞および他の神経細胞は、銀鏡下に見られる。図9C、光受容体細胞による銀鏡の層および蛍光発光光学の下で見られる注入部位近くのrMAY-GFPg1接種された眼由来の銀鏡。図9D、注入部位から遠位の部位での図9Cと同じ底からの銀鏡の蛍光。図9E、図9F、図9G、および図9Hと同じ動物の本注入の銀鏡からの銀鏡の蛍光。

図10. pCERLANTERNINプラスミド。GFPは、本発明のヒト化GFPを示す。他の複数的エレメントおよび制限部位が示される。

好ましい実施形態の詳細を説明

クラゲグリーン蛍光タンパク質 (GFP) は、レポーター遺伝子としての使用のための有望な候補として提唱されている。しかし、gfp遺伝子の重要な要素は、それが哺乳動物細胞系で十分な表現を全じないことがある。実際に、組換えアデノウイルス (AAV) によりヒト細胞に送達されたクラゲGFPレポーター遺伝子を発現するような本発明者らの最初の試みは、失敗した。

本発明者らは、GFPの発現の重要な理由は、ヒト細胞膜におけるGFPの乏しい脂質効率であると仮定した。これは、クラゲにおいて使用されるものと異なるインセプションのセクターにより各々分けられる。見度の問題を解決することにおいて、それ故、本発明者は、哺乳動物細胞（特に、ヒト細胞の細胞）における高レベルの発現に適合されたクラゲグリーン蛍光タンパク質 (GFP) とT12の合成バージョンを提供する。本発明に従って、基底置換が、gfpのコード配列内のコドン

図3. pT12-pT12系列の組換えプラスミドでトランスクレオチドされた293細胞のpAC分析。293細胞（6ウェルディッシュ）が、既往のカルシウムリントラヌスフェクションプロトコルを使用して、25μg/mlのG418（これは、異なる比のgfp含有プラスミドおよび選択或処理されたサケ種子キャリア細胞からなる）でトランスクレオチドされた。細胞は、トランスクレオチドの実時間後には回収され、そしてフローサイトメーターで分析された。陽性として記録された細胞は、トランスクレオチドされたgfp含有プラスミドの量の関係としてグラフ上にプロットされた。透明のバーは、pT12-pT12に対応し、影付きのバーは、pT12-GFP1に対応し、そして黒いバーは、pT12-βgalに対応する。

図4および図4A、図4B細胞内でのrMAY-GFPg1の発現。293細胞は、G418耐性rMAY-GFPg1に100 μMで感染された。感染後2時間の細胞が、ORION Filter Cube 440/410 GFP-IR (450/1-26nmで選択) を使用して、蛍光顕微鏡で撮影された。図4A、位相差の下での底面、明視野 (light field)；図4B、同じ視野、追加蛍光 (epi fluorescence)。

図5A、図5B、図5C、および図5D. rMAY-GFPg1プロウイルスを含むG418耐性クローニングの蛍光。293細胞は、G418耐性rMAY-GFPg1に100 μMで感染された。感染後時間の細胞は、分離され、そして既に (10%未満) コンフルエンスでプレートされた。1時間後、G418は、200μg/mlの最終濃度で添加された。培地は、4日毎に交換され、そしてG418耐性コロニーは、選択の14日後に撮影された。図5Aおよび図5C、位相差の下でのG418耐性コロニー、明視野；図5Bおよび図5D、同じ視野、追加蛍光。

図5A、図5B、図5C、および図5D. rMAY-GFPg1、rMAY-GFPg1、またはrMAY-GFPg1で感染した細胞で、そして2週間後G418で選択された293細胞のpAC分析。図5A、293細胞株のPACSヒストグラムプロット；図5B、rMAY-GFPg1で感染細胞で撮影されたPACS；図5C、rMAY-GFPg1；および図5D、rMAY-GFPg1。各場合について、20,000個の細胞が測定された。各細胞現象について、異性と記録された細胞の割合が示されている。未感染細胞：1.05% (GFP) ; 1.05% (GFP) ; 1.67% (GFP) ; 2.81% (GFP) であった。

使用頻度を変化させるために、gfpコドンにおいて替換され、それにより哺乳動物細胞膜中の発現により適切となる。哺乳動物およびヒト細胞における遺伝子の選択および表現のための、発現プラスミドならびに一連の供用組換えベクターおよびベクターもまた、提供される。

細胞の好ましい表面において、本発明は、哺乳動物およびヒト細胞における高レベル表現に適合させたVictoriaグリーン蛍光タンパク質 (GFP) の特徴の合成バージョンに関する。この構成的な構造物において、T12の底面が、gfpコドン配列内でのコドン使用頻度を変化させ、そして哺乳動物細胞における発現を細胞的に改善するために、80のコドンにおいて作成された。

蛍光組織については、本発明者らは、gfpレポーター遺伝子の感受性を、ヒト化構造物について第2位。そして第2のヒト化構造物について少なくとも4倍増加させた。ヒト化遺伝子組織物のPACS分析において、1つの構造物が、少なくとも細胞、元のクラゲ遺伝子より感受性であって、そして、他の構造物は、100倍、元のクラゲ遺伝子より感受性であった。ヒト化GFPが、G418耐性細胞においてrMAYプロウイルス (gfp-neo) カセットの一一部として安定的に取り込まれた場合、細胞のかなりの部分が、視覚的に検出可能なGFPを発現する。

以降に公開されたデータによると、rMAYは振り返し反復として、1~10の範囲の細胞当たりのゲノムコピー数を取り込む (Chemir5、1990; Laughlinら、1986; Belanochinら、1989; Samoilovら、1989)。したがって、強力プロモーターの制御下で、細胞当たり1~10コピーのヒト化GFPの範囲は、本明細書に記載されるように、検出される。特定のGFP実質体について、この数は1と同じくらい低くあります。

ヒト化GFPを有する使用のための利用ベクターの1つの例として、rMAYベクターが提供される。ベクターのpT12-IF (使用者に優しい) シリーズの最初 (図2A) は、rMAYベクターの構造物において、便宜と実用性を提供する。GFPの最大クローニング容量を使用するために、全レポーター遺伝子カセットがgfpIIでの消化により欠損させられ、したがって、GFPの反復およびバッケージングのために必要な配列のみであるIFの2つの末端反復のみが残る。

piTgs-1¹ シリーズは、2つのレポーター遺伝子をセットである GFP および DsRed (それぞれ自身のプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを有する) を含む。これらの2つの長さ単位は、独立に大量増殖 (GFP に対しては XbaI-NheI 消化、そして DsRed に対しては SalI 消化) 、これは目的の長さのためのクローニングスベースを増大させる。このように使用される場合においてさえも、このベクターは、1.5kb までの別の長さ単位を適応させ得る。

さらに、与えられた組合せまたは組合において特定のプロモーターの効率はまた、ベクター-1¹ が EcoRI および SalI で消化した後、gfp 遺伝子の 5' プロモーター上流にこれを接続することにより試験される。piTgs-1¹ ベクターの設計はまた、DNA レジメントの使用により、レポーター遺伝子および同じプロモーター-1 由来の目的の遺伝子レポーターの協調発現を可能にさせる。

さらに、本発明者は、GST エレメントの斜面下、ヒト化 GFP レポーター遺伝子を有する G シャトルベクターの構成を記述する。組合せ A が生成させた細胞は、代表的な GFP および明るい緑の蛍光を示した。GFP の発現は、迅速で簡便な真の組換組合のクローン選択を、偽のブラークと区別することを可能にする。

ヒト化 GFP はまた、他のウイルスおよび非ウイルスベクターおよび発現系に取り込まれる。本発明のヒト化遺伝子およびベクターを使用して、哺乳動物およびヒト細胞における gfp 遺伝子配列の効率的な導入および発現が可能である。

これは、本明細書に記載されるように、モルモット眼の特異感覚細胞内のインビオの遺伝子表現により、説明される。ヒト化 gfp 遺伝子は、蛍光活性化細胞選択 (FACS) による細胞選別、およびヒト遺伝子治療におけるような多くの使用を有する。

実際、本明細書に記載された系は、哺乳動物細胞の細胞において、単純 FACS による検出を可能にするのに十分な感受性レベルの遺伝子の導入および発現を媒介することが示される。G411 のような変異体で示された細胞の選択、あるいは β -ガラクトシダーゼのような酵素活性の可視化のための細胞の選択は、このように、省略される。M7G および从が、例のように、非常に広範な宿主範囲を有するため、記載されたベクターは、ヒト遺伝子治療を含む、多数の

遺伝子選択技術において有用である。

1. グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子

グリーン蛍光タンパク質遺伝子および構造的なタンパク質は、表 1 に示されるように、個々の生物において、存在していると考えられる。このような遺伝子を見渡す任意の生物が光活性タンパク質および有機物由来の gfp 遺伝子は、本発明に従って、ヒト化 gfp 遺伝子を調整するための出発点として使用される。

表 1

グリーン蛍光タンパク質 (GFP) を有する生物蛍光活性化物および有機物		
門/目	属	参考文献
原生動物	Amoebozoa	Maria および Borlagi, 1971
ヒドロ虫綱	Giella	Maria および Borlagi, 1971
	Phytomonadida	Maria および Borlagi, 1971
	Microtrichida	Prather, 1995
	Campanularia	Maria および Borlagi, 1971
	Acylida	Maria および Borlagi, 1971
	Alveolata	Maria および Borlagi, 1971
	Diaphysida	Maria および Borlagi, 1971

刺胞動物	Rhizostoma	Templer 5, 1973
花虫綱	Phialidaceae	Templer 5, 1973
	Stylopidae	Templer 5, 1973
	Actinodictyon	Templer 5, 1973

インビオのグリーン蛍光から推測される GFP の存在

現在、*A. victoria* 由来の gfp 遺伝子配列が、市販入手可能であるため、ヒト化 gfp 遺伝子を作製するためのテンプレートとして使用されることが好ましい。gfp 遺伝子配列の生物的意義は構造的な同様物がもちろん、本発明に包含されるが、遺伝子を切断するための試みが、蛍光を喪失する前に、たった 1 つの試みがアミノ酸末端。そして 10 または 15 以下の試みがカルボキシ末端から活性に喪失することが示された (Dep および Borlagi, 1995) ことを含めすべてある。それゆえ

、実質的に記載された gfp 遺伝子は、特に有用であることが企図されない。しかし、このようなタンパク質のための 1 つの使用は、それに続く抗体産生のための哺乳動物細胞における高レベルの GFP 産生であり得る。

2. グリーン蛍光タンパク質

Leptothrix GFP は、235 アミノ酸残基のタンパク質である。その最大の蛍光ピークは、455nm のより小さなピークを有する 395nm である。これらのピークの増幅 (すなわち、蛍光強度) は、それそれ 1~10 および 7~15nm (1cm) と見限もられており (*Morita* および *Ward*, 1991)。395nm での強度は、50nm において最大蛍光を生じる。量子収率または光子の再発光の確率は、一旦分子が励起されると、0.72~0.85 (*Orlitz* および *Ward*, 1992) であり。そして既知の特徴的励起波長は 315nm である (*Orlitz* および *Ward*, 1992)。

GFP は、歩しく安定なタンパク質であるため、それらのスペクトル特性が光学成像中で比較的影響を受けない。構成されたタンパク質はまた、既知例にわたって、ほとんどのプロテアーゼに耐性がある (*Ward* 1981, 1982; *Ward* および *Orlitz*, 1982; *Cotter* および *Ward*, 1992)。しかし、変性の際に、GFP がその蛍光を失う

(*Ward* および *Ward*, 1980)。中性水性蛋白質溶液において、蛍光を示す限界は、*Leptothrix* GFP (*Ward* (1981)) の場合、70°C であると見い出されている。*Leptothrix* GFP は、側鎖アミジン-161 (92°C で 2 分間)、92% での活性化または組合でのアルカリ化の側鎖を使用すれば、蛍光が全て失失して変性されるが、GFP を使用して蛍光を回復させることは可能である (*Ward* および *Orlitz*, 1982)。この復元には、デオールが必要であるようである (*Orlitz* および *Ward*, 1983)。

Ser155, Tyr66, および Cys161 の側鎖ならびにチロシンの 1,2-脱水素化により形成される、GFP 発色体、p-ヒドロキシジリデンイミダゾリンを形成するために、別の *Leptothrix* 遺伝子に対する絶対的な必要性はない。この複合の開拓後複合の側鎖は、GFP が、遺伝子表現の変化を報告し得るスピードにおける例である。

変性タンパク質または変色团を含む单離ペプチドは、光を吸収するが、実質的に蛍光である (*Ward* および *Ward*, 1980)、というのは、おそらく、むき出しの発色团が

、厳密でもないか。荷電分子による反応から保護されてもいいからである。発色团形成は、もちろん、いずれの有用な GFP 実験または複合体において接着を保持したままでなければならない。

既存および *Morita* 記載では、37°C で発現される GFP は、15°C で発現される GFP よりも蛍光強度が弱い。然し、主に、適切に成熟した GFP の発現レベルまたは明るさを低減させることによるよりはむしろ不適当な成熟化を生じさせることにより作成する (*Lin* および *Lin*, 1995)。

蛍光フィルターで自己した野生型 *Leptothrix* GFP は、同様の波長範囲分子よりも約 10 倍の強度の発光を示す。波長に立たない。というのは、このような波長は、過度な光活性化を生じ、そしてまたバックグラウンド自己蛍光により自己するからである。

3. GFP 実験体および変異

本実験体からクローン化される GFP は、上述のような低い明るさ、タンパク質合成度と蛍光強度と複合体光活性化との間の適切な調節を含むいくつかの遺伝子ではない活性を有する。しかし、GFP は、これらの欠損を軽減するため、および発色团および蛍光波長がシフトされ、異なる色および新しい適用を作成するため、第二世代の化合物を提供する目的のために再構成される。

GFP におけるほとんどの変異体は、相対蛍光度または蛍光ピークにおいて顕著な変化のない、蛍光の部分的または完全な欠損を生じる。これらの変異体は、おそらく、タンパク質の誤り組み、発色团の形成不全、または不完全な蛍光による蛍光の抑制 (quench) を起こす。遺伝子を切断する試みは、蛍光が消失する前に、1 つの位置のみアミノ末端から活性にされ得、そして 10 または 15 以下の位置がカルボキシ末端から活性にし得ることを示した (Dep および Borlagi, 1995)。主導的なトランケーションに対する GFP の非対称性は、おそらく、それはどうかべきことではない。というのは、タンパク質骨格は、発色团を含め、そして周囲の水から活性に遮断されなければならない。

GFP ポリペプチドにおけるアミノ酸置換は、異なるスペクトル特性を有するタンパク質を生じることがすでに報告されている。変異体のリブセットは、おそらく

くを色団の既プロトント化を促進するか、または阻害する、395nmおよび475nmにおける既光度ピーキーの相対度に影響する。例は、T2031 (Thr-Tyr) およびT222C (Gly222-Cys) であり、これらは、それぞれ、395nmまたは475nmのいずれかにおいて单一の既光ピーキーに対するスペクトルを単純化する (Ehrigら, 1995)。既光体T167T (Ile-Tyr) は、2つのピーキーの野生株の割合を、どちらかを完全に消去することなく変換させる (Ehrigら, 1990)。

第二の変異体のサブセットは、実質上、完全に変換した特異を有する新しい既起および既光スペクトルを生産する。この型の変異体の例は、既光团領域そのものの中に見い出される。

(d) Tyr既光変異

Agrobacter GFPおよび海シタケ*Reolina resiformis*のGFPは、同一の既光団を共有し、さらに*Agrobacter* GFPは、395nmにおける单一の既光ピーキーのみを、*Agrobacter* タンパク質の主な395nmピーキーよりも高い既光度を示す。多くの実験の適用について、*Reolina* GFPのスペクトルは、*Agrobacter* GFPよりも好ましくあり得る。というのは、異なる既光と共鳴エネルギー移動の挙動との間の既光の既異は、既成スペクトルが、最もかつ広いよりはむしろ高い場合、より簡単であるからである。

さらに、*Agrobacter* GFPのより長い既光の既光ピーキー (475nm) は、既光フィルターセット (gel) にとって既に理想的であり、そして既光白に抵抗性であるが、既光白により感受性であるより短い395nmの既光ピーキーより、長い既光を有する (Gallieら, 1994)。前述の理由のため、*Agrobacter* GFP既光スペクトルの单一ピーキーへの変換は、この点もしくは、より長い既光が好ましい。

このような変換は、GFP変異研究および変換されたスペクトルを有するGFP変異体を単離するスクリーニングを記載したBeilisら (1990) により達成された。中心チロシン (Tyr) の他の芳香アミノ酸 (Tyr, Phe; またはPhe) による重複は、既起および既光スペクトルを逐次的により短い既光にシフトさせる。

Beilisら (1994) は、ヒドロキシルアミン処理 (SilksorkiおよびBock, 1991)

を用いて、そして0.1M NaCl, 50mM DTT, および200mMのGDP、GDPおよびPIP (Kishidaら, 1992) を用いるPCETMの既光率を増加させることによってgel-DNAのランダム変異研究を実施した。毎上のコロニーは、475nmが395nmにおいて既起され、キセノンランプで点滅され、そして出力ビームが全体の培養皿を照射するために変換するためのモノクロメータで度合いを付ける場合、異なる既光色および明るさの割合について可視的にスクリーニングされる。

野生型タンパク質の既起と対的にPIP既光および既光白のブルーにより既起可能な変異体は、Beilisらにより早期された (1994)。最も既起および既光は、野生型GFPの最大既起および既光から、それぞれ、40および40nmの既光団にシフトされた。決定的タンパク質の変異則は、既光団の中心にTyr-Tyrへの変換を含んだ。Tyr-Tyrの既光スペクトルは、タンパク質が、変性寸前のまでの既光化には敏感ではなく、このことが、既光団が既起に接近可能でないことのさらなる既起を促進する。

トリプトファンおよびフェニルアラニンへのチロシンのさらなる部位特異的変異研究が実施された (Beilis, 1994)。トリプトファンは、チロシンとヒステジンとの間の半胱の既起および既光波長を与えたが、わずかな既光のみであり、これは、おそらく、既起または既光団領域が不完全である一方で、フェニルアラニンは既起可能な既光を与えなかったためである。

Tyr-Tyr既光変異体は、野生型GFPよりも既光が少ないが、これはおそらく、別のアミノ酸が、中心側に既起していないからであり、もちろん、これは重要な変異体である。異なる最大既起および既光を有するGFPのいくつかの既光の利用可能性は、下記のように異なる既光子既現の2色群集、既光度およびタンパク質構造 (Tyr-Tyr) が可能となる。

(e) Ser既光変異

ReolinaのGFPにはるかに近いスペクトルを有するSer既光変異体を加付する研究はまた、Beilisら (1995) の研究を既報づけた。*Agrobacter* GFPのアミノ酸配列のセリン(Ser)、D-ヒドロキシペングリデンイミダゾリン既光団の部分となる。Serはがビニル側鎖を形成するためのさらなる脱水活性を実施するという仮説を検証

するために、Beilisら (1995) この残基をAla、Leu、CysまたはThrに変換させた。ビニル基がそのまままたはSerの側面により形成される場合、SerおよびCysは、除去が不可能な点およびSerとは非常に異なる同一のスペクトルを与えるはずである。

Beilis (1995) は、その極が、同じ分子でもたり野生型GFPのそれよりも4倍から6倍強度である、470-490nmに位置づけられる单一の既光ピーキーを示す4つの既光変異体を作製した。これらの結果は、ビニル基を既起する、Ser-Tyr既光変異体は、さらなる特徴付けのために選択された。というのは、これが既起および既光の最も長い既光 (490nmおよび410nm) であり、*Reolina* GFP (438nmおよび400nm) について既起される既光および既光波長に非常に類似しているからである。

新生のポリペプチド鎖から既光を生産するための決定的既光既現化は、野生型タンパク質 (Beilis, 1995) におけるより、S65Tにおいて約4倍速速に進行した。この加速は、迅速な既起下限等のためのレポータータンパク質としてのGFPの使用における潜在的に重要な固定を改善する。

Ser65Tyr、Ala、Asp、PheおよびSerへの変異は、既光強度を野生型の強度よりもはるかに低くした。

まとめると、Ser65Tyr-GFP変異体 (Beilis, 1995) の有利な特徴は、以下を含む: 各々が、その最も長い既光ピーキーにおいて既起される場合野生型よりも倍

より長い既光: 野生型より4倍速速な既光既現への既現化: および既光活性化がないことおよび非常に速い既光白のみ。前述の見見は、Ser65Tyrが、空気飽和した両Tyrの既起波長で、438nm既起における約7分の1の既光率で既光白する。Ser65Tyrの既起波長は、これらの条件下で約7分の4の既光であるので、Ser65Tyrの既光白の量子効率は、約4分の1の既光であると計算される。

これらの利点は、既被既起既現または既光活性化が必須である場合以外のほとんどどの適用について、Ser65Tyrを、野生型GFPより能力的なものにする。これは、特に、一般に人手可能な既光イソシアート (ITTO) フィルターセット (450-480nm波長) を使用するより既光度感度を提供する。

(f) 他の赤色シフト変異体

Delagraveら (1995) はまた、GFP既起44-58の既起ランダム変異研究を実施し、そしてスペクトルが上記のSer65Tyr変異体に既に既現する6つの変異体を導出した。そのうち4つは、上記の列挙した既位で同じ置換基 (Leu、CysまたはAla) を有した。

スペクトル的にシフトしたGFP変異体の構築のためにDelagraveら (1995) によって使用された方法は、以前に既報化した組み合わせの変異既現およびデジタル画像既光分析器 (DIS) (GoldmanおよびTorres, 1992; DelagraveおよびTorres, 1995) を使用してスペクトル的に異なる種々のバクテリオクロロフィル結合タンパク質を既現するためで既現されている。

DISは、空間的に解析したスペクトル情報を得ることにより、ペトリ皿での数千のコロニーを直接的に既起スクリーニングを可能にする (Torresら, 1995; Torres, 1994)。異なる既現で既現したペトリ皿の内側は、荷重共役デバイス (CCD) カメラによりとらえられ、そして既起既現の校正を確立するソフトウェアによりさらに処理される。既報化された組み合わせの変異既現およびDISを用いて、さらなるGFP変異が導入される。

Delagraveら (1995) のコンピュータリアルライブリースクリーニングにおいて、変異既現のために既報化したGFP既現は、Phe64とGly69 (Phe-Ser-Tyr-Gly-Tyr-Gly: 配列番号4) の間の6つのアミノ酸配列であり、これは、既光強度

も含む。変異オリゴマクレオチドは、6位に芳香アミノ酸を取り込むことを好み、他の5つのコドンは完全にランダムになるようのように既現された。変異既現のために使用されるオリゴマクレオチドの既現は、CyberDopeコンピュータープログラムを用いて導かれた。

得られた約4×105の変異GFP遺伝子のライブリーリーは、M21 (DIS) で既現された。ペトリ皿上の数千のコロニーを、DIS (Delagraveら, 1995) を用いた既光によりスクリーニングした。スペクトル的にシフトした変異体は、最初に、450nm光で既起した場合に既現されるグリーン既光により同定される。これは410nmで既起した場合に既現する。対称的に、野生型GFP既光は、410nm既起よりはるかに明るい。DISは、104コロニーにつき約1個が既現の既光タンパク質を既現する

ことを明らかにした。

Delagraveら (1995) は、いくつかの色シフト GFP (ESGFP) クローンを出し、そして配列決定した。Type I および Type II は、保存されているよう見られたが、他の 4 つの位点はより少なくストリップメントであった : Ser65P, 産業される表現型には必要ではなかった。ESGFP は、常に新生型 GFP から変換される。なぜなら、その最大効率は、野生型 *Aequorea* GFP における 290 nm から ESGFP における 490 nm と、約 100 nm 色シフトするからである。1 つの特徴的なクローン EES GFP があり、これは、発色团配列 Met Gly Tyr Gly Val Leu (配列番号 5) を有する。ESGFP の発光は、ほとんど野生型 GFP の発光と同一であるが、輪郭スペクトルが前者に異なる。

Delagrave ら (1995) は、この配列情報を指揮的アンサンブル変異選択 (Exponential Ensemble Mutagenesis) (EEM) やおよび併用アンサンブル変異選択 (Decartesian Ensemble Mutagenesis) (DEM) 技術 (Delagrave らおよび Tourniau, 1992; Delagrave ら, 1993) による異なる操作に影響を受け、多スペクトルの光活性タンパク質の「レインボー」を潜在的に生産することを報告した。EEM または DEM により選択された新しいコンビナトリアルライブラリーを構築することにより、機能的変異体の選択が、通常の色光シフトを有する蛋白質クローニング (rare clone) の導入に間に合うことが予想される。

4. ヒト化GFP遺伝子

野生型 GFP の特徴が変異体において、上記のように改善されるにも関わらず、野生型 GFP は、各々のタンパク質分子が数千の色変化または光分子を生成し得る真の多様性レポーター系に組み入れられる複数の 1 つの段階を欠損している。各々の蛋白質が、GFP 発現の比較的高レベルな 1 つの発光團を有するため、複数の分子が、明るいシグナルをもたらすのに必要であり得る (Kirkpatrick ら, 1995)。

上記は、本発明の重要性 (哺乳動物およびヒト細胞における増強した GFP 発現のために選択される本発明の特徴) を強調する。上記の変異体の多くまたは前述の変異体または変異体のパネルがまた、本発明で提供されるようにヒト化パック

グラウンドにおいて開発され得る。これは、本発明のヒト化局所が、タンパク質の側鎖配列を独立的に変換するからである。

哺乳動物細胞における GFP を発現する以前の試みは、Total配列 (Adam ら, 1995) を使用してきた。このように変更した GFP 遺伝子は、哺乳動物発現ベクターに挿入され、CD4-EGFP (Adam ら, 1995) において使用されてきた。Perez (1995) はまた、一過性の GFP 発現 C05-T, RelA, および RSV 3T3細胞を報告している; そして Kirkpatrick ら (1995) は、GFP のインクタクトな細胞におけるミトコンドリアにおける発現を報告している。しかし、これらの研究は、比較的低レベルの発現を反映していると考案されおり、さらに、多數の当事者により得られたネガティブな結果と対照されるときも見られる。これらの少ないポジティブな結果は、細胞に導入された高コピー数の GFP 遺伝子の累積であると考えられる。

本発明によりとられたアプローチは、Adam ら (1995) の方法に背離的であり、そして哺乳動物細胞における発現により直切であるようにコドンを使用するため、遺伝子組合を含むヒト化を使用することによってヒト細胞環境における GFP mRNA の質的な発現強度に取り組む。このようなヒト化構造物を使用することにより、ヒト化 GFP 遺伝子の高コピー数 (例えば、10 以下の範囲で、そして特徴のヒト化 GFP 発見遺伝子を使用した場合には 1 または 2 でさえもあり得る) を有する細胞におけるグリーン発光を生じる。

上記の蓄積と、タンパク質発見遺伝子における各々のコドンの構成との間の

相関は、E. coli, 痘苗、および他の生物 (Bennetzen やおよび Hall, 1992) ; Graham ら, (1980) ; Graham ら (1981) ; Ikemura (1981a; 1981b; 1982) ; Ikeda (1990) について記載されている。しかし、コドン変換が突然に、任意の与えられた遺伝子で行われるまで、それらの細胞組合および全細胞の発現レベルへの影響は確立されない。これは、EEM 配列に説明する状況に類似しており、これは、予測にも関わらず特に GFP の発見遺伝子における発現増加に寄与するとは考えられていない。本発明者らがヒト化が GFP 遺伝子発現について効果的であることを示した現在、GFP 技術の有用性が患者に用意される。

クラゲ GFP が本発明に従ってヒト化するために、本発明者らは、まず、GFP 遺伝

子のコドンの詳細な分析を行った。表 2 は、クラゲ GFP コドンとヒト遺伝子で共通に使われるコドンとの間の比較の結果である (Padua ら, 1996)。これが、本発明者らが、GFP と一致的なヒト遺伝子配列との間の重要な差異を判定し、そしてそれらを変換を固定することを可能にした。

本発明による、ヒト化配列の例は、配列番号 3 によって示される。しかし、本発明のヒト化配列が配列番号 3 の代表的な配列には全く固定されないことが理解される。むしろ、以下の指示により、当事者が、多数の異なるヒト化 GFP 配列を容易に調査し得る。

ほとんど使われないクラゲのコドンをヒト遺伝子でより頻繁に使用されるコドンで置換した後は有用な変換であると考えられるが、特定のコドン変換は、もちろん、必ずしも好まれる。この意味で、本発明者らは、ヒト遺伝子においてはほとんどまたはほとんど全く使われない多数の GFP コドンを同定した。下記のように、このようなコドンは、本発明によるヒト化遺伝子を生産するために考慮される第一の候補である。

一般的なヒト化改造体を作成するにおいて、ヒト化されるべきコドンは、本発明者の中の表 3 に示す 3 および表 4 において示される情報を調べることから当事者がによって同定される。例えば、表 3 における情報を利用することにおいて、当事者は、ヒト遺伝子において通常に使用されるそれらのコドンの頻度に対してクラゲコドンの頻度を比較し、そして任意の適切な変換を行う。例示のためだけに、アミノ酸ロイシンを考える: コドン GAG, GCT, GCG および GAC がそれぞれ置換する。

このコドンは、ヒト遺伝子において 4 番目に好ましいにすぎないコドンに対応する。ロイシンコドン GAG はまた、クラゲ遺伝子において重要な特徴を示し、そしてこのコドンはヒトゲノムにおいて使用するための最終の選択である。従って、ロイシンコドンを変換することには、ヒト化遺伝子を調査するために適切な開始点をなす。

表 2 の分析に従ってなされ得るさらなる変換は、アルギニンコドンの AGA (これはヒトゲノムにおいて 4 番目の選択にすぎない) をより好ましいコドン (例え

ば、GCG または AGG) に変更すること; セリンコドン (例えば、AGG または GCG) をより好ましいコドン (例えは、GCA および GCG) に変更すること; スレオニンコドンを GCA に最適化すること; プロリンコドン GCG の使用を避けること; アラニンコドン GCA を最も好ましいヒトコドン GCA に変更すること; 優れたグリシンコドン GCA および GCG の使用を避け、そしてそれらをヒト遺伝子において好ましいコドン GCA および GCG の使用すること; 結果に出現するバリンコドン GCG および GCG を避け、そしてその代わりにコドン GCA (これはヒトゲノムにおいて明らかに好ましい) を使用すること; およびイソロイシンコドン GCA を避け、そしてこれを好ましいコドン GCG に変更することである。

2 つのコドンの選択しかしないアミノ酸において、発明者らは、ヒトゲノムと比較した場合、野生物 GFP 遺伝子は最も好ましくないコドンを過度にすることに見付いた。従って、適切な変換が以下のコドンにおいてなされる: リジンに対する LAL; グルタミンに対する GLM; ヒスチジンに対する HHD; グリタミンに対する GLM; アスパラギンに対する ASN; およびフェニルアラニンに対する FAL; そして、これらを LAL, GLM, GLH, HHD, GLM および ASN がそれぞれ置換する。

さらなる変換もまた、表 3 および表 4 における情報を考慮することからなされる。これらの表は、容易に使用される形式で、コドン優先度に関する重要な情報を提供する。表 3 は、本発明のヒト化改造体における使用について好ましいコドンの一覧を提供する。表 4 は、表 3 の相互参照を便利にするために、T (チミン) よりも U (ウツジン) を組み込んだ全く同一の構成である。

表 3: ヒト使用について好ましいクラゲコドン

ヒト遺伝子におけるコドン配列								
アラニン	Ala	A	GCC	OCT	GCA	GGG		
システィン	Cys	C	TGC	TGT				
アスパラギン	Asp	D	GAC	GAT				
グルタミン	Glu	E	GAG	GAA				
フェニルアラニン	Phe	F	TTC	TTT				
グリシン	Gly	G	GCC	GGG	GA	GGG		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAT				
イソロイシン	Ile	I	AIC	ATI	ATA			
リジン	Lys	K	AAA	AAA				
ロイシン	Leu	L	CTG	CTC	TTC	TGA	TAA	
メチオニン	Met	M	ATG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAT				
オルニン	Orn	P	CCC	OCT	CCA	CCG		
グルタミン	Glu	Q	CAG	CAA				
アルギニン	Arg	R	CCC	AGG	AAA	CGG		
セリン	Ser	S	AGC	TOC	TCT	AGT	TCA	TGA
スレオニン	Thr	T	ACC	ACA	ACT	ACG		
バリン	Val	V	GTG	GTC	TTT	TTA		
トリプトファン	Trp	W	TGG					
チロシン	Tyr	Y	TAC	TAT				

左のコドンは、ヒト遺伝子における使用のために最も好ましいコドンを示し、ヒト使用頻度は右に向かうほど減少する。
右下線コドンは、ヒト遺伝子においてほとんど使用されないコドンを示す。

表4：ヒト使用のための好ましい類似コドン

ヒト遺伝子におけるコドン配列								
アラニン	Ala	A	GCC	CCU	GCA	GGG		
システィン	Cys	C	TGC	TGU				
アスパラギン	Asp	D	GAC	GAU				
グルタミン	Glu	E	GAG	GAA				
フェニルアラニン	Phe	F	TTC	TGU				
グリシン	Gly	G	GCC	GCG	GGA	GGG		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU				
イソロイシン	Ile	I	AUC	AUU	AUA			
リジン	Lys	K	AAA	AAA				
ロイシン	Leu	L	CUU	CUC	UUG	CUU	CGA	TUA
メチオニン	Met	M	AUG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU				
オルニン	Orn	P	CCC	CCU	CCA	CCG		
グルタミン	Glu	Q	CAG	CAA				
アルギニン	Arg	R	CCC	AGG	AAA	CGU		
セリン	Ser	S	AGC	UCC	UCU	ACU	UCA	UCC
スレオニン	Thr	T	ACC	ACA	ACU	ACG		
バリン	Val	V	GUU	GUC	GUU	GUU		
トリプトファン	Trp	W	UGG					
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				

左のコドンは、ヒト遺伝子における使用のために最も好ましいコドンを示し、ヒト使用頻度は右に向かうほど減少する。
右下線コドンは、ヒト遺伝子においてほとんど使用されないコドンを示す。

左のコドンは、ヒト遺伝子における使用のために最も好ましいコドンを示し、ヒト使用頻度は右に向かうほど減少する。
右下線コドンは、ヒト遺伝子においてほとんど使用されないコドンを示す。

れるコドンは、全体において作型されることが望まれる改变の数に依存して、およびコードされる特徴のアミノ酸に依存して改変されても改変されなくてよい。
1および2列目に挙げられるコドンは、野生型gtl配列に存在する場合、二つのコドンの選択が利用可能ではない限り、一般に直切であり、そして改変を必要としない。しかし、2列目のコドンを1列目のコドンで置換することは、特に二つのコドンの選択しかない場合、間違いなく有効な選択である。この情報を考慮すると、gtl配列に改変を導入する場合、可能な部位はどこでも1列目のコドンを導入することが一般的に望まれる。

前記の議論を考慮して、配列番号3の類似的配列は、本発明によって包含される多くの作型可能な一つであるにすぎないことは明白である。配列番号3において、封じコドンは一つ以上の塩基置換を含む。328アミノ酸をコードする配列からの封じコドンは、約5%を改変を示す。しかし、コドンの約10%を改変することは、発現レベルにおける有用な増大を生成し、従ってこのような遺伝子配列は本発明の範囲内にあることが確認される。クラゲgtl配列内のコドンの約5%、約10%、約20%、または約30%を改変することもまた有効であると考えられ、そして本発明のヒト遺伝子は、上記範囲内にあるこれら遺伝子配列を含むする。

特許の実施形態において、導入したコドン改変の性質に依存して、gtl遺伝子のコドン使用頻度における10%改変をすることさえ必要なかもしれない。例えば、10の最も好ましいコドンの各々が改変され、そしてヒト遺伝子における使用に最も好ましいコドンで置換される場合、得られる配列はトト取おより哺乳動物において然るな表現を達成し得ることが確認される。改変から封じコドンを改変することは、約1%の改変パーセントを示す。従って、以下の条件一すなわち、図示された数の改変のみをなす場合、gtl遺伝子配列のコドン位置は、5

3、53、125、150、178、195、206、236、および224にある10のコドンを改変することが一概に望まれることを考慮すると、いわゆる「4%ヒト化遺伝子」はまた、本発明の範囲内にある。多くの他の改変とともに、これらの主要な改変をなす場合、これらのコドンの少なくとも約7、8、または9を改変することは、改善

された表現を作りヒト化遺伝子を生じるに十分である。上記のように、ロイシンは、好ましくは、CTG、CTC、またはTTCによってコードされ；バリンは、好ましくは、GTCによってコードされ；そして、セリンは、好ましくは、AGCによってコードされる。

約1~5%、約10%、約20%、または約30~50%のコドンが改変されたgtl遺伝子配列は一般に好ましいが、前述される場合、さらなる改変がなされるべきではないという理由はない。従って、本発明に従うヒト化遺伝子配列は、完全長コドン領域内の約5%、約10%、約20%、約30%、または約40~50%のコドン位置でヒト化コドンを含む記述する。なおさらなるヒト化改変を導入することを目的として配列番号3を改変すると、さらなる置換化改変が導入される多くの位置が予測される。これらは、例えば、配列番号3のコドン位置5、9、14、17、19、21、23、25、27、31、33、34、35、36、40、45、50、51、62、71、83、93、101、102、111、115、116、121、122、123、134、136、142、157、171、172、174、181、182、186、209、216、211、223、および236で見出されるコドンを含むする。

5. グリーン蛍光タンパク質の使用

レポーター分子としてのgtlの可能性は、迅速な検出（グリーン蛍光タンパク質は、標準的な成長培養用光源を使用する照射で検出される）；インピボでのリアルタイム検出の可能性；マトリックスの導入を必要としない事実；および相対的に小さな大きさ（25~50）および準量体の性質（これは、タンパク質融合を最小限にする）のような特徴から生じる。

本発明のヒト化gtlは、これらの方法のいくつかに理論的よりも実行性をもつて、ヒト化gtl遺伝子は準量体化されたタンパク質を、例えば、蛍光活化化セルソーティング（FACS）または蛍光顕微鏡によって同定するために：インピボ

およびインピボで遺伝子表現を測定するために；多頭底生地における特定の細胞を識別するために、例えば、細胞系統を研究するために；導入タンパク質質を認識し、そして位置づけるために；および細胞内輸送（internalization）などを研究するために、使用される。

GFPの標準的な生物学的な適用は、見落とされなければならない。例えば、タンパク質ゲルおよびウェスケンプロット上の分子量マーカーとしてのその使用、蛍光計およびSDS装置のキャリブレーションにおけるその使用、ならびに細胞および組織へのマイクロインジェクションにおけるその使用。

蛍光分子量マーカーを発生する方法において、一般的に、ヒト化GFP遺伝子配列は規定されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする一つ以上の試験配列に組合され、そして融合タンパク質は発現ベクターから発現される。発現は、マーカーとして使用される既定された分子量（完全なアミノ酸の大きさの界線に従う）の蛍光タンパク質の産生を生じる。

好ましくは、精製度はタンパク質は、サイズ分画に（例えば、ゲルを使用することによって）供される。次いで、本知のタンパク質の分子量の測定は、蛍光標準からの検定基準を作製し、そして両者から実際の分子量を読みとることによって行われる。

（a）異なる星色化?

上記のように、異なる星色形態を生産するヒト化GFPにおけるアミノ酸置換は、複数のレポーター遺伝子の同時使用を可能にする。異なる星色化ヒト化GFPは、組合配列技術において複数の細胞集団を同定するため、または複数の細胞群を追跡するため簡単に使用される。これはさらなる試験を追加するかまたは細胞を同定するかまたは細胞を追跡する必要を伴わずにリアルタイムにおいて可視化される細胞変動または細胞移動における変異を可能にする。

他の選択は、單一細胞、組織、または器官内の複数のタンパク質の最終的な位置の追跡および決定：同一の問題、組織、または器官において2つの異なるプロモーターからの遺伝子表現を抑制するティフランジナルなプロモーター分析；および組合細胞集団のFACSソーティングを含む。

細胞内でタンパク質を追跡するにおいて、ヒト化GFPタンパク質改変体は、フ

ルオレセインおよびロードミンに類似した模式で使用され。そして相互作用タンパク質またはサブユニットをタグ化し、次いで、その両端性はインクタクトな細胞において蛍光共鳴エネルギー転移によって力学的にモニターされ得る（Adamsら

、1991；1993）。

スペクトルで分離可能なヒト化GFP改変体を用いて使用される技術は、共焦点顕微鏡、フローサイトメトリー、ならびにモジュラー流路および二重顕色技術を使用する蛍光活性化セルソーティング（FACS）によって例示される。

（b）トランسفェクトされた細胞の同定

ヒト化GFPが使用される多くの技術は、特定の広い領域に分類され得る。まず細胞を簡単に同定すること。これらの方法において、ヒト化GFPは、細胞においてGFPを発現するため導入して使用される。この方法についての一つの使用は、細胞を異なる細胞群の存在する環境に導入する前のため導入した单細胞改変または細胞の細胞の収集における使用である。元の細胞のみでのGFPの後出によって、このような細胞の位置を決定し、そして全叢団と比較することが可能になる。

第2の群の方法は、目的の外因性環境でトランسفェクトされた細胞に同定に関係する。外因性環境でトランسفェクトされた細胞を同定することは、多くのインビトロ実験装置において必要とされ、そしてまたインビトロ遺伝子治療においても必要とされる。

この一般的な群の第一の例は、コードされたタンパク質をGFPを用いて直接的に標識するため、選択したタンパク質をコードする試験配列にヒト化GFP配列が組合される場合である。細胞においてこのようなヒト化GFP組合タンパク質を発現することにより、容易に後出される蛍光タグ化タンパク質の生成を生じる。これは、タンパク質が発現した宿主細胞によって発生されていることを簡単に確認するにおいて有用である。それによってまた、選択したタンパク質の位置を（これが天然の位置を表しているのかまたはタンパク質が人の手によってオルガニクスに標識されたかどうか）検出することが可能になる。

外因性環境でトランسفェクトされた細胞はまた、融合タンパク質を作製することなく同定され得る。ここで、この方法は、少なくとも2つの転写または翻訳

単位を含むプラスミドまたはベクターを受容した細胞の同定に供する。第一の単位は、所望のタンパク質をコードし、そしてその発現を用意し。一方、第二の単位は、ヒト化GFPをコードし、そしてその発現を監視する。第二の転写または

細胞単位からのGFPの同時発現は、ベクター古河細胞が検出され、そしてベクターを含まない細胞から区別されることを意味する。

（c）プロモーターの解析

本発明のヒト化GFPはまた、哺乳動物細胞におけるプロモーターの解析に別の次元を提供する。それは今や、哺乳動物細胞およびヒト細胞において発現され得、そして容易に操作されるのである。ある細胞のプロモーターが、所産の遺伝子、組織、または系を用いる使用のためのそれの適合性について評議される得。これは、インビトロ使用に（例えば、細胞内発現および高レベルタンパク質産生における使用に適切なプロモーターを同定するにおいて）適合し、そしてインビトロ使用に（例えば、細胞内試験においてまたはヒト被取締での遺伝子治療において）もまた適合する。

実験的な用語において、プロモーターを解析するために、コントロール細胞または系がまず創立される。コントロールにおいて、属性の結果は、公知かつ決定的なプロモーター（例えば、本明細書中で記述される研究の特定の局所において特徴的なGFPプロモーター）を使用することによって確立される。後述プロモーターを構成するために、発現ベクターまたは遺伝子供養系において異なるプロモーターが存在することを除いては、全ての条件が同じである別の細胞または系が構立される。コントロールと同じ条件および同じ条件下でのアッセイの実施後、属性的なGFP発現レベルが測定される。これにより、後述プロモーターと併記された標準プロモーターとの精度または適合性の比較が可能になる。所定の研究において日本内に記載されるGFP発現系を使用するにおいて、属性コントロールは、試験プロモーターの特定の研究においては、省略してもよい。

この様式において試験され得るプロモーターはまた、長鎖組合特異的プロモーターおよび短鎖選択性プロモーターを含む。短鎖組合特異的プロモーターは、所定の細胞用に用いることによって、所定の細胞用に好ましいかまたは最適なプロモーターである細胞の属性のあるプロモーターから同定し、特徴付けることが可能になる。さらに、これには、インビトロおよびインビトロの両方で有用である、超強え発現およびタンパク質産生において所産のプロモーターおよび所産の細胞型の組

合を最大化することは、最も高い可能なレベルが達成されることを研究するためにはしばしば必要とされる。

本発明のこれらの細胞は、分離細胞を用いるタンパク質産生における使用のための供給プロモーターを解析するために使用され得る。これらの実験装置において、プロモーターから発現されるGFPは、細胞から細胞外環境（次いで、そこでGFPは検出される）におそらく分離される。

標準性プロモーターを用いるヒト化GFP遺伝子の使用は、本発明の別の局所を想起する。タンパク質産生の目的のための複数え発現において、細胞培養または細胞用の特定の時間で発現を説明するが所見され得る。細胞または所定の系内における所産のタンパク質の分離を解析するにおいて、所定の条件下（例えば、所産のサイトカインまたはホルモンの存在下）でのみスイッチが入れられるプロモーターを使用することはまた有用である。

細胞性プロモーターを用いるヒト化GFP遺伝子の使用はまた、プロモーター自身の解析にまで及ぶ。本明細書での例は、道端を過して日々の生物において発現されることが公知であるプロモーターのある群（例えば、熱ショックタンパク質と同調するプロモーター）からの所定のプロモーターの解析である。この方法において、例えば、道端で作用可能なプロモーターは、それが哺乳動物細胞においても作用可能かどうかを決定するために、そして、それゆえ、哺乳動物細胞が、該プロモーターのホモログをおそらく含むかどうかを決定するために、取得され得、そして哺乳動物細胞系において発現され得る。

組織特異的プロモーターおよび細胞特異的プロモーターの使用は、インビトロ実験装置において特に有力である。動物における治療用遺伝子を発現させる場合において使用される場合、このようなプロモーターの使用によって、所定の組織で、所定の細胞および/または規定された条件下でのみの発現を可能にする。これは、遺伝子発現を、所定の細胞群、組織、または領域に限ることを可能にし、そしてよりの身体を過して遺伝子発現を制御する重要な利点である。癌の治療においてしばしば用いられるので、組織特異的発現を達成することは、所定の遺伝子治療適用（例えば、細胞癌性因子の発現）において特に重要である。有益な

効果を有する他の治療用遺伝子を発現するにおいて、当然、組織特異的表現はまた、それが治療の効果を最適化する点において好ましい。

適切な組織特異的および親導性プロモーターは当該者に公知である。例示のために、肝臓細胞結合 (TFB) タンパク質遺伝子プロモーター (大鼠上皮細胞に特異的) ; インスリン遺伝子プロモーター (詳細記載に特異的) ; トランスフィレチン (transferrin) , α -1-アンチトリプシン、プラスミノーゲンアクチベーター-1ヒビターキー1 (PAI-1) , アボリボタンパク質およびDNA結合型遺伝子プロモーター (例々、肝臓細胞において特異的または優先的な表現を指向する) が挙げられる。脳組織において活性的なプロモーターとしては、ミelin 基導性タンパク質 (MBP) 遺伝子プロモーター (脊髄起始細胞細胞に特異的) ; グリヤ酸導性タンパク質 (GAP) 遺伝子プロモーター (グリヤ酸細胞に特異的) ; および神経細胞に特異的である神経特異的エノラーゼ (NSE) プロモーターが挙げられる。

インビオ使用のための親導性プロモーターは、好ましくは、生物学的に適合的な因子、好ましくは、通常、選択された動物組織において出会う因子に応じてあるプロモーターを含む。一例は、ヒトPAI-1プロモーターであり、これは選択された因子によって選択される。さらに適切な例は、チトクロームc550重伝子ナプロモーター (種々の酵素および他の因子によって選択される) ; 肝ショックタンパク質遺伝子 (種々のストレスによって選択される) ; ホルモン選択性遺伝子 (例えば、エストロゲン遺伝子プロモーター) などである。

電離放射線によって選択されるプロモーターはまた、特定の実施形態において、特にガンの選択子治療において使用される。ここで遺伝子死現象は電離放射線 (例えば、UVまたはX線) によって選択されることによってガン細胞において選択的に選択される。電離放射線によって選択性である適切なプロモーターとしては、(a) 1, 10, および10aが挙げられる。

(d) スクリーニングプロトコル

本発明のヒト化GFPとともにプロモーターを使用することのさらなる実現は、スクリーニングプロトコルにおけるその使用である。これらの実施形態 (これら

は、一般的にインピトロで行われる) において、遺伝子操作された細胞は組成物における特異的化合物または因子の存在を同定するために使用される。

スクリーニング実施形態において、ヒト化GFP遺伝子は同定することが望まれる因子によって選択されることが公知であるプロモーターの下流に位置づけられる。加熱におけるGFPの表現は、正常にはサイレントであり、そして選択された因子を含む組成物に細胞を暴露することによってスイッチが入れられる。例えば、重金属、毒素、ホルモン、サイトカイン、または他の選択された分子に応じてあるいはプロモーターを使用することにおいて、重金属、毒素、ホルモン、サイトカインなどの存在は、容易に決定される。

前記の実現から、本発明のスクリーニング実施は2つの基本的な部に分けられ、それは防衛用新規生物学的および「化学生物的」と呼ばれる。

生物学的アッセイにおいて、生物学的なエフェクター分子によって選択性であるプロモーターの制御下のヒト化GFP遺伝子を含む細胞は、種々の選択的生物学的サンプル (これには血液、血漿、精液、尿、唾液などを含む) 中のこのような分子の存在を検出するために使用される。このような方法で後述可能であるこれらのエフェクター分子は、ホルモン、サイトカイン、神経伝導物質などの分子を含む。当然、本願を適して使用される場合、术语「プロモーター」は、任意の調節エレメントを含むために使用されることが理解される。本明細書における特異の例は、所定の組成物中のステロールを検出するためにヒト化GFPと併用するステロール側鎖エレメントの使用; 血清标志エレメント (これは、IgG、IgM、IgE、およびIgAによって認識される) の組成の使用である。

いわゆる化学生物的アッセイにおいて、化学的因子によって選択性であるプロモーターの制御下のヒト化GFP遺伝子を含む細胞は、種々の組成物中の化学的因子の存在を検出するために使用される。これらのアッセイは、液体 (例えば、飲料水など) 中の毒物または混入物を検出するために使用される。この方法で検出される因子のタイプは、重金属、毒物、および他の種々の所産物ならびに非所産の化学物品を含む。

当然、任意のスクリーニングアッセイは、所定のプロモーターからの遺伝子表現を阻害するか、抑制するか、またはそうでなければ、ダウンリギュレートする

因子を後述する情況において使用されることが理解される。このようなネガティブな効果は、遺伝子表現が選択因子の存在に応じて「スイッチを切る」場合に生じる蛍光のレベルの減少および低減された蛍光によって検出可能である。

(e) FACS分析におけるGFP

多くの選択的FACS法は、培養細胞に結合した蛍光色素の使用を必要とする。蛍光標識タグ化されたタンパク質は、FACS実験における培養細胞に対して好ましい。なぜなら、細胞は蛍光タグ化試薬とインキュベートする必要がなく、そして抗体結合物の弁別具の結合によるバックグラウンドがないからである。蛍光は安定であり、そして我々は既存で、いかなるマトリックスも選択する必要がしないので、GFPはFACSにおける他のものに特に適切である。

他の発現実施形態において、所定のタンパク質は、GFP結合タンパク質を調製し、そして細胞内に発現させることによって直接的にGFPで認識される。GFPはまた、上記のように所定のタンパク質を発現する発現ベクター内で第2の転写または翻訳単位から同時に発現される。GFPはFACS分析によって検出され、そしてリードされる。FACS分析は、レポーター遺伝子としてGFPを使用する場合、遺伝子発現およびプロモーター活性をモニターする手段として使用される。

(f) GFP自身または使用されるが) 一方翻訳GFPは、FACSを用いる使用に特に適切である。ほとんどのGFPは強度で使用されるアルゴンイオンレーザーは、488nmで照射し、したがって、該方翻訳GFP変異体の检测 (例えば、発起ビーカーは約490nm) は、野生型GFP検出よりも効率的である。FACS技術を用いるGFPの最も良い使用は、本明細書中に示される。

5. GFP結合タンパク質

ヒト化GFP遺伝子は、融合タンパク質の一部として使用される。これはタンパク質の位置を同定することを可能にする。「外因性」タンパク質とのGFPの融合物は、GFPの蛍光および宿主タンパク質の複合 (例えば、牛乳牛の乳癌細胞および/または癌細胞) の両方を検出するべきである。

GFPのアミノ末端およびカルボキシル末端の両方は、任意の所定のタンパク質

と実際には結合され得、固定可能なGFP-融合物を作製する。野生型遺伝子を使用して説明されたおよび末梢タンパク質の融合物の両方が報告されている (HirayamaおよびBazilige, 1994)。GFPのカルボキシル末端へのタンパク質の融合は、リンクー配列によって増強されるかもしれない。

(a) 検出下限

局在化研究は、細胞下分画によっておよび免疫蛍光によって以前に行われてきた。しかし、これらの技術は、細胞周囲におけるある時間でのタンパク質の位置の「スナップショット」のみを与える。さらに、人工細胞が、細胞が免疫蛍光のために固定される場合、固定されると、生細胞においてタンパク質を可視化するためにGFPを使用することは、個々の細胞中で細胞周期を通してタンパク質を追跡することを可能にし、従って重要な技術である。

ヒト化GFPは、種々の条件下で轉写後翻訳およびヒト細胞における細胞内タンパク質輸送をリアルタイムで分析するために用いられる。細胞を固定するごとから生じるアーティファクトは回避される。これらの適用において、ヒト化GFPは、その状態下の位置を異なる天然の条件下で調べるために、公知のタンパク質に融合される。

Pines (1995) は、一連のトランスフェクションによって哺乳動物細胞培養細胞で発現された、GFP-サイクリンキメラを作製するためのタグとしての野生型GFPの効用を記載した。予備的な実験において、GFPならびにGFP-水溶性GFP-サイクリンキメラの両方が、生細胞において検出され、そして蛍光が、このような細胞において長い間持続された。

Pines (1995) は、サイトメガロウイルス初期プロモーターを用いて、一連のトランスフェクションされた細胞においてGFP発現を遮断させ、そしてGFPをCD5-7, IL-2R, IL-2R, およびIL-2R結合において発現させた。全ての場合において、キメラは12時間後に免疫蛍光によって検出されたにもかかわらず、蛍光が検出される前にラグ期間 (>15時間) が存在した。これは、細胞中に約1時間かかるGFPが自己強化するための要求に起因する (IgGら, 1994)。哺乳動物細胞におけるこれらの研究とは対照的に、本発明は、GFP蛍光が約6時間で検出可能であったというはっきりとした利点を有する。

Plies (1995) および他の研究において、GTPはタンパク質の天然の細胞下場活性を妨害しなかった。Plies (1995) は、GTP半胱氨酸（側鎖より組成質の側方）に分離していることを示した。サイクリンAにタグ化された場合、主に存在することが見出され、そしてサイクリンBにタグ化された場合、それはB型サイクリンに存在して最小質または小胞区画と結合しながら、組成質に存在することが見出された (Plies, 1995)。

ヒト化GTPは、実質的に任意のタンパク質をタグ化し、そして異なる条件下でタンパク質の位置を追跡するために用いられる。例えば、所定のタンパク質の、試験分離、有系分離、アボーティッシュ、または他の組成質アセスを適用した細胞において、所定のタンパク質の位置もまた、外的制御の度に応じて検出される。このような測定は、異なる物理的条件（例えば、温度または酸素濃度、およびさらに異なる化学的環境）を含む、用語「化学的探査」により、通過し得る天然の度数（例えば、酸または血清培養液などの見られるレベルを有する量度）およびさらにエフェクター分子が加算されている組成物の両方を意味する。

エフェクター分子を有する組成物は、所定の細胞における応答を説明するため用いられる。本発明のヒト化GTPは、所定のエフェクターまたはアゴニストに対する細胞の応答が決定されるアッセイにおいて用いられる。このような方法を用いることによって、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質、または他の因子に応答した所定のタンパク質の位置が決定される。タンパク質の位置が、変化する外的制御によって変わること、およびタンパク質が、内胞区画（例えば、外膜、サイトゾル、小胞体、および核区画）間を移動することは既知である。

③ GTP基団部内化

GTP結合タンパク質の別の使用は、タンパク質の天然の行き先であるけれどもタンパク質が特定の細胞区画への輸送を経た後、標的化タンパク質の特定の場所での検出においてである。これを達成するためには、標的化配列（例えば、核またはミトコンドリア標的化配列）は、GTP配列とともに所望のタンパク質に融合される。これは、タンパク質の天然の位置がGTPを用いて決定される上記したばかりの方法とは対照的である。

故は、その技術の概要を説明することを助ける多くのタンパク質を含む。これ

らのタンパク質は、それらが生成されるサイトゾルから移入される。これらは、核の内部（核内腔）に測定するためには、該の外膜をより内腔の両方を通り抜けで通過しなければならない。この輸送プロセスは、選択的である：サイトゾルで生成された多くのタンパク質は、核から除外される。多くの核タンパク質は、孔チャンネルを拡大しながら核中へタンパク質を活発に輸送する。孔隙上に局在するレセプタータンパク質と相互作用する。

該過程の選択性は、核移入シグナルに存在し、それは核タンパク質においてのみ存在する。核移入シグナルは、いくつかの核タンパク質において選択子活性技術を用いて正確に規定されている。タンパク質のどこにでも局在され得るシグナルは、正に荷電したアミノ酸残基およびアルギニンが豊富であり、そして通常プロリンを含む組合ペプチド（代謝的には4～8アミノ酸残基）からなる。例えば、T抗原核移入シグナルは、Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val (配列番号6)である。

ヒト化GTPは、構造物（この中で、所定のタンパク質が、GTPおよび核膜内化配列に融合される）の発現の後に、選択されたタンパク質が核内に移入されたことを確認するために用いられる。これは、基礎科学におけるインビトロ研究の一部として、またはインビオラボの一部として（例えば、充細胞の核などへの蛋白の指向において）用いられる。

核膜内化シグナルのヒト化GTP遺伝子への最初はまた、発現されたタンパク質の蛍光強度を、核のよりずっと小さい空間にタンパク質を限局することによって増強させるために用いられる。これは、本明細書中に文献例6に示すGTP抗体の実験において記載される。

既存タンパク質分子は、（例えば、有系分離後に）補り返し移入される必須があるので、その核移入シグナルペプチドは、核への移入後に切断されない。対照的に、一旦タンパク質分子が、任意の核の膜上オルガネラ（membrane-bound organelles）によって移入されると、それはその区画内で代謝から逆代へと受け取られ、そして再びトランスロケーションされる必要がない。それゆえ、これらの分子上のシグナルペプチドは、タンパク質トランスロケーションの後にしばしば除去される。

且アミノ末端シグナルがマトリックスプロテアーゼによって切断されると、遺伝子配列は、内膜にタンパク質を再移入するためのシグナルペプチドとして機能する。マトリックスからこの移出は、おそらく核膜へのタンパク質移入に用いられる技術に既存の構造によって起り、そしてこれはミトコンドリア内でコードされるタンパク質を内膜中へ導入するために用いられる技術でもある。サイトゾルからミトコンドリア内膜へのタンパク質の輸送もまた、線木性シグナルペプチドを必要とする。

全細胞内でのミトコンドリアの動きを可視化するためのGTPおよびミトコンドリア標的化配列の使用は、Mizutaniら (1995) によって報告されている。ローダミンのような色素とは対照的に、GTPを用いることは、オルガネラ活性化を消失させる薬物によってミトコンドリア内で発現された形態学的变化が明らかにした

これらの研究において、Mizutaniら (1995) は、チトクロムCオキシダーゼのサブユニットIVの動態のアミノ末端アミノ酸（これは、ミトコンドリア標的化配列を用いる）をコードするDNAフрагментを融合タンパク質コード配列の一部として用いた。キメラDNAはアミノ末端からカルボキシル末端へ、以下をコードするよう作製した：ミトコンドリア標的化配列および成熟チトクロムCオキシダーゼタンパク質のアミノ酸；いくつかのリンカーアミノ酸；およびGTP。この構造は、ミトコンドリアへ移入されたGTPを発現した。

ヒト化GTPの使用は、Mizutani (1995) によって記載されるタイプの研究（ここで、単にミトコンドリアを全体として標識することが所望されている）の改良である。ヒト化GTPはまた、選択されたタンパク質が、構造物（この中で、所望のタンパク質が核およびミトコンドリア標的化配列に融合される）の発現の後にミトコンドリアへ移入されることを確認するために用いられる。ここで、ミトコンドリア標的化配列は、融合タンパク質の末端に（コード挿入の3末端に）位置されるべきである。

7. 遺伝子治療適用

首尾良い遺伝子治療は、一般に、遺伝的障害を矯正し得る遺伝子の宿主ゲノムへの組込みを必要とする。宿主ゲノムにおいて、この遺伝子は、宿主DNAと共に

ミトコンドリアは、二重膜有機オルガネラであり、電子輸送および酸化的リソームによるGTPの合成に特異化されている。それらのタンパク質のはほとんどは、細胞膜によってコードされ、そしてサイトゾルから移入される。さらに、各移入タンパク質は、それが標識する特定の小胞区画に到達しなければならない。ミトコンドリアには、4つの小胞区画がある：マトリックス空間；内膜；質膜空間；およびサイトゾルに対する外膜。これら的小胞区画のそれぞれには、異なるセットのタンパク質を含んでいる。

ミトコンドリアの合成研究は、蘇生（融合タンパク質（組成部GTP技術によって蘇生される）をコードするハイブリッド遺伝子が確実に導入される）の使用によって近年にされている。ミトコンドリアマトリックスへ移入されるタンパク質は、これらが遊離のポリリボソームから放出されてから1～2分以内に、通常サイトゾルから取り込まれる。

移入されるタンパク質は、たいていいつもシグナルペプチド（20～40個アミノ酸）をそのアミノ末端に有する。移入された後、シグナルペプチドはミトコンドリアマトリックス内の特定のプロテアーゼ（シグナルペプチダーゼ）によって迅速に除去され、大いでもそらくマトリックス内でアミノ酸に分解される。シグナルペプチドは、最もほど簡単であり得る。シグナルペプチドの長さが量的に減少される分子遺伝子実験は、1つのミトコンドリアタンパク質について、ミトコンドリア移入を合図するため、12のアミノ酸のみがアミノ末端で必要とされることを示している。これらの12個基は、通常の組成質タンパク質に付着し得、そしてタンパク質をミトコンドリアマトリックスへ向かせる。

全長シグナルペプチドの動態的研究は、正に青電した段階が全てヘリックスの初期に對応し、一方赤青電の酸性基が対応側に向かって對応する。両親性のロヘリックス構造を形成し得ることを示す。ミトコンドリア移入配列の例は、Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg Thr (配列番号7) である。

ミトコンドリア質膜空間へのいくつかの前駆体タンパク質の輸送は、マトリックスへのそれらの最初の移出で開始される。ここで、各々に酸性のアミノ酸配列は、核内に移入を惹起するアミノ酸シグナルペプチドの後に置かれる。一

と、またはその配列内にgfpまたはヒト化gfpをコードするDNA配列を含む二本鎖ベクターの二本の鎖を融解分離することによって行われる。所望の変異配列を保有するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般に合成的に、例えばCreaら(1978)の方法によって調製される。次いで、このプライマーを一本鎖ベクターとアニーリングさせ、そして変異導入鎖の合成を完了するためには延伸合成法(例えば、E.coliポリメラーゼIIクレノウフラグメント)に供する。従って、ヘテロ二重鎖が形成され、ここで一方の鎖は、元の非変異配列をコードし、そして第二の鎖は、所望の変異を保有する。次いで、ヘテロ二重鎖ベクターを用いて、適切な酵素(例えば、E.coli KOD)を作用を施し、そして変異された配列配列を保有する組換えベクターを含むクローンが選択される。

適切な技術はまた、本明細書中で参考として引用される米国特許第5,032,280号に記載されている。

部位特異的変異調査を用いる選択されたヒト化gfp遺伝子の配列改変の実験は、潜在的に有用なGFP蛋白を生成する手段として開拓され、そして開拓することを意味しない。なぜなら、GFPの活性化変体が得られる他の方法が存在するからである。例えば、所望のヒト化gfp遺伝子をコードする組換えベクターは、変異性の因子で処理され得、配列改変体を得る。(ヒドロキシルアミンを用いるプラスミド法の変異調査については、例えば、Eidelberg, 1971)によって記載される方法を参照のこと。

前述の方法は、変異調査における更に適切であるが、ポリメラーゼ連鎖反応の技術の使用が、ここでは一概に好ましい。この技術は、所望の変異を所定のDNA配列中に導入するための迅速かつ効果的な方法を提供する。以下の文は、所望の配列によってコードされるアミノ酸を変更するために用いられるよう、点変異を配列に導入するためのPCR法の使用を特に記載する。本方法の適応はまた、DNA分子中に複数導入部位を導入するためにも適切である。

この方法において、合成カリゴヌクレオチドは、複数されたセグメントの一端に点変異を組み込むように設計される。既に既に設計、複数されたフラグメントは、クレノウフラグメントで処理することによって平滑末端化され、次いで、こ

の平滑末端化されたフラグメントは、配列分析を容易にするためにベクター中に連結され、そしてサブクローン化される。

変異発見しようと所望するテンプレートDNAを調製するために、PCRを高コピー

数ベクター(例えば、KCI9)中に、変異される領域に接続する倒置部位を用いてサブクローン化する。次いで、テンプレートDNAをプラスミドミニプレップを用いて調製する。細胞内に蓄積する所望の点変異を含み、そして引端で倒置部位が接続する適切なオリゴヌクレオチドプライマーは、自動化合成装置を用いて合成される。プライマーがテンプレートDNAに対して約1塩基ずつ間隔であることが、一般に必要とされる。プライマーは、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製され得るが、これは、PCR法における使用に絶対に必要なわけではない。次いで、オリゴヌクレオチドのG末端がリン酸化される。

テンプレートDNAは、所望の点変異を含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRによって増殖される。増殖箇所中のGATCの位置は、一般に約15箇所である。一般に、約20~50サイクルのPCRが以下のように行われる: 35°Cで5秒の変性: 50°Cで2分間のハイブリダイゼーション; そして72°Cで2分間の伸長。PCR法は、一般に72°Cで約10分間の最後サイクルの伸長を含む。最後の伸長工程後、約5単量のクレノウフラグメントが変異導入側に導入され、そして約3°Cでさらには15分間インキュベートされる。クレノウフラグメントのエキソヌクレアーゼ活性は、平滑末端クローニングのために末端を平滑かつ適切にするために必要とされる。

得られるPCR増殖物は、増殖が予想された生産物を生じたことを確認するために、ホモジナガロースゲル電気泳動またはアクリルアミドゲル電気泳動によって一般に分析される。次いで、反応混合液を、純度のほとんどを除き、クロロホルムで抽出して残りの油を除去し、純化エチノールで抽出し、次いで100%エチノールで沈殿させることによって調製することによってプロセスする。次に、増殖されたフラグメントの約半分を、オリゴヌクレオチドにおいて使用された倒置部位で接続する倒置部位で消化する。消化されたフラグメントを低ゲル化/溶解 (low melting/melting) アガロースゲル上で精製する。

フラグメントをサブクローニングし、そして点変異をチェックするために、2つの増幅フラグメントを、平滑末端連鎖によって、直ちに導入されたベクター中にサブクローニングする。これは、E.coliを変異体換するため用いられ、既にこのE.coliから、プラスミド法がミニプレップを用いて変異を得る。次いで、

で、正確な点変異が生成されたことを確認するために、プラスミドDNAの端部された部分はPCR法によって分析される。Taq DNAポリメラーゼが異なる変異をPCRフラグメントに導入するので、これは重要である。

点変異の導入はまた、連続的PCR工程を用いてもたらされる。この手順において、変異を導入する2つのフラグメントが互いにアニーリングされ、そして相互にプライムされた合併によって伸長される。次いで、このフラグメントは、第二のPCR工程によって増幅され、それにより上記のプロトコルで必要とされる平滑末端連鎖を回復している。この方法において、テンプレートDNAの調製、オリゴヌクレオチドプライマーの合成、および第一のPCR増幅は、上記のように行われる。しかし、このプロセスにおいて、選択されたオリゴヌクレオチドは、テンプレートDNAに約15~約25サイクルのPCR法を、上記の条件を用いて行う。再び、フラグメントをサブクローニングし、そして点変異が正確であったことを完全に確認した後を用いてチェックする。

以下の方法のいずれかの使用において、町度な取り小さなフラグメントを増幅することにより変異を導入することが一般に好ましい。もちろん、オリゴヌクレオチドの融解温度のようなパラメーターはまた、一般に重量およびオリゴの長さにより影響されるため、注意深く考慮されるべきである。これらの方法の実行および必要な場合のこれらの最適化は、当業者に公知であり、そして既に文献(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, 1995(本明細書中に参考として引用される))にさらに記載される。

10. 発現プラスミドおよびベクター

広範な種々の組換えプラスミドおよびベクターがヒト化gfp遺伝子を発現するために操作され、それにより既にGFPを発現するために使用される。

本明細書中で使用される用語「発現ベクター」は、核内配列が哺乳動物細胞またはヒト細胞において発現される、ヒト化gfp遺伝子の核内配列を含む任意の

タイプの遺伝子発現装置を含む。本明細の発現ベクターはまた、本発明自体により構成されるように、GFPタンパク質への露出を指向する。ヒト化gfp配列に加えて、発現ベクターは一般に、通常その細胞および使用を容易にするためにベクターにおいて用いられる制限酵素切断活性および他の機能。終結および介在DNA配列を含む。

哺乳動物細胞において使用するための発現ベクターは、通常、複数組成(必要に応じて)および発現される蛋白質の前に位置するプロモーターを含む。詳しくは、ポリアデニル化部位および翻訳終止配列が含まれる。リボソーム結合部位および脱スプライス部位がまた含まれる。例は、SV40性質化DNA 18S/19Sスプライスドナース/スプライスラクサセプターシグナルである。

複数組成は、外因性起点を含むようなベクターの構成(例えば、SV40または他のウイルス(例えば、ポリオ、アデノ、T5、M13)供給源由来であり得る)により提供される)か、または由来細胞染色体複製後継により提供される。ベクターが宿主細胞染色体に組み込まれる場合、後者がしばしば十分である。プロモーターは、以下に述べられる。

特許の開始シグナルがまた、紹介的な複数のために必要とされる。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび複数配列を含む。ATG開始コドンを含む外因性複製開始シグナルは、さらに提供されることが必要とされる。当業者は、容易にこれを決定し得、そして必要なシグナルを選択し得る。開始コドンが、挿入部位の複数を確定するために、所前のコード配列のリーディングフレーム内でインフレーム(または、インフェーズ)でなければならぬことを知り得る。これらの外因性複製開始シグナルおよび開始コドンは、元始および合成の両方の側への起始であり得る。発現の単位は、適切な逆エクレメントおよび逆ターンオーバーを含むことにより増殖され得る(Reitterら, 1987)。

哺乳動物において、最初のクローニングされたセグメント内に含まれない場合、典型的には直列なポリアデニル化部位（例えば、5'-AATGAA-3'）を転写部位に取り込むこともまた所望される。典型的には、ポリA付加部位は、タンパク質の転写終点の前に位置する終結部位の約30~2000ヌクレオチド「下流」に位置される。ポリアデニル化シグナルの特性は、本発明の旨によく実施に適するである。

とは考えられず、そして任意のこのような配列が用いられる。SV40、ウシ痘ヘルモン遺伝子およびシグナルは使用され、よく機能することが知られている。

組換えタンパク質の表現、自家免疫のために、安定な表現がしばしば好ましい。ここで遺伝子組成は、ウイルス複数起点を含む表現ベクターを用いるよりも、適切な表現用エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）および選択マーカーにより制御されるベクターを用いて表現が選択される。従って、ヒト化gfp配列および選択マーカーを組み合わせた使用がまた意図される。

外因性の導入に強く安定な表現において、操作部位は、実験操作において1~2日間選択され、次いで選択部位に切り替わられる。組換えプラスミドにおける選択マーカーは、選択に対する耐性をもつ、そして細胞にその染色体中にプラスミドを完全に取り込まれ、そしてフォーカスから増殖され、次いでクローニングされ導入して細胞内に拡大される。

多数の遺伝子が使用される。たとえば、gfp配列、またはgpt配列においてそれぞれ単離ヘルペスウイルスチミンキナーゼ（Ingermanら、1977）、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスクレオチド（Sakselaら、1987）、およびアデニンホスホリボシルトランスクレオチド（Lowら、1980）を含むが、これらに制限されない。また、抗体耐性が、メトトレキセートに対する耐性をもつる（Bullockら、1978；Gibsonら、1981）；マイコフェノール酸に対する耐性をもつる（Bullockら、1981）；アミノグリコシド-41Rに対する耐性をもつる（Colberre-Darfeuilleら、1981）；およびハイグロマインに対する耐性をもつる（Golletteら、1984）の選択のための基盤として用いられる。

好ましいベクターは、組成において複数性の複数起点および典型的な初生物質

耐性遺伝子（これらはむれぞれ忍耐能表現部位において増殖および選択を可能にする）ことがまた意図される。

好ましいベクターにおいて、gfp融合タンパク質の作製を容易にするために、6FPコード配列の末端で複数のクローニング部位（NCL）がまた提供される。また、目的の遺伝子における便利な制限部位とともに、インフレーム結合物を作製させる3つの異なるリーディングフレーム内に存在するはずである。

組換えベクターにおける向じプロモーターからの異なる遺伝子の組合発現は、RESエレメント（例えば、下記のようなpSEC-I由来のポリオウイルス1型の内部リボソーム導入部位（RIP）なら、1993）を用いて選択され得る。

11. プロモーター

組換えベクターは、1つ以上のプロモーターの制御下のタンパク質コード複数セグメントを含む。コード配列をプロモーターの「制御下」にあくために、一般に選択したプロモーターの約1~5ヌクレオチド下との間の「下流」（「なむち、ア」）にヒトリーディングフレームの転写開始部位の「末端」を位置させる。「上流」プロモーターは、既の段落を制御し、そしてコードされた組換えタンパク質の表現を促進する。

「プロモーター」は、細胞の合成過程または導入された合成過程により認識され、特定の遺伝子の転写を開始するために必要な制御配列をいう。本明細書中に使用されるプロモーターは、哺乳動物細胞およびヒト細胞において作動可能であるはずである。句「作動可能」および「転写開始部位を発現する」は、ヒト化gfp配列に適して正しい位置および方向にあり、既にポリメラーゼの開始およびヒト化gfp遺伝子の発現を制御することを意味する。

ヒト化gfpを発現するため使用されるプロモーターは、本発明には重要ではない。例として、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）即時初期遺伝子プロモーターが使用されており（Thomassetら、1980）。これは外因性遺伝子の構造的な高レベルの発現を生じる。しかし、当該分野に周知の他のウイルスまたは哺乳動物細胞用プロモーターの使用もまた、ヒト化gfp遺伝子の発現を達成するために適切である。

多数のウイルスベースの表現系が利用される。例えば、通常使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス、およびシミアンウイルスのSV40由来である。SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、その両方がSV40ウイルス複数起点をまた含むフラグメントとしてウイルスから容易に得られるので、特に有用である。より小さなまたはより大きいSV40フラグメントもまた使用され得。同様にラウス肉腫ウイルス（RSV）を末端遺伝子（LTR）も使用される。

同様の特性を有するプロモーターを用いることにより、ヒト化gfpの発現のレ

ベルおよびバーンがはるかに簡便化される。例えば、特定の細胞型において特異的に活性なプロモーターの選択は、細胞特異的表現を可能にする。このようなプロモーターは、大鼠上皮細胞に特異的な肝臓特異的（P40）タンパク質遺伝子プロモーター；腎臓細胞に特異的なインスリン遺伝子プロモーター；それぞれ肝臓細胞において特異的または選択的な死細胞用選択的タンパク質レセプター（lysophosphatid）；△1-脱トリプシン、プラスミノーゲンアチペプチダーゼ-1（TPP-1）；アボリボタンパク質A；および脱レセプター-選択子プロモーターのようないくつかのプロモーターを含む。肝臓細胞において活性なプロモーターは、オリゴデオキソリナリアに特異的なミエニン酸性タンパク質（RFP）遺伝子プロモーター；クリア管内に特異的でアミノ酸性タンパク質（RFP）遺伝子プロモーター；および神経細胞に特異的で神経細胞のエノラーゼ（NSE）プロモーターを含む。

さらに、特定の化合物または生物学的シグナルに応答して誘導されるプロモーターの選択は、ヒト化gfp遺伝子の選択性発現を可能にし得る。適切な選択性プロモーターの例は、P40-1、シトクロームP450遺伝子プロモーター、差ショックタンパク質遺伝子プロモーターおよびホルモン選択性遺伝子プロモーター。ならびに電気誘導線により誘導可能なgfpおよびgfpプロモーターを含む。

上記のように、選択性プロモーターは、インビボ（例えば、遺伝子敲除）およびインビトロ（スクリーニングアッセイ）で有用である。細胞内の特定の化合物の存在についてのスクリーニングにおいて、該化合物プロモーターの有用な事は、2、3の例として、重金属により活性化されるプロモーター（redoxoら、1993）；ある範囲の毒性化合物により活性化されるシトクロームP450遺伝子プロモーター。

ター；種々のストレスにより誘導されるヒトgfpプロモーターのようないくつかのタンパク質遺伝子プロモーター（Giriagaら、1992；Reichら、1993）である。

12. RES

内部リボソーム結合部位（RIP）RESエレメントは、複数長性またはポリシストロン性メッセージを作製するために使用される。RESエレメントは、5'メチル化cDNA供給部位のリボソームスキャニング酵素をハイバシ侍、そして内部部位で翻訳を開始し得る（DelteilらおよびSolsberg 1980）。ビカノウイルス（picornavirus）

ロファミリー（ポリオおよび風疹ウイルス）の3つのメンバー由来のRESエレメント（DelteilらおよびSolsberg, 1980）ならびに哺乳動物メッセージ由来のRES（SakselaらおよびSaksela, 1991）が記載されている。上記の任意のものが本発明に該当するヒト化gfpベクターにおいて使用される。

RESエレメントは、異常オーブンリーディングフレームに適応される。複数のオーブンリーディングフレームが一緒に転写され得、各々はRESにより分離され得。ポリシストロン性メッセージを作製し得る。RESエレメントの長所により、各オーブンリーディングフレームは並列的な翻訳のためにリボソームに接近し得る。この様式において、複数の遺伝子（その1つはヒト化gfp遺伝子である）は、1つのメッセージを転写するための1つのプロモーター／エンハンサーを用いて効率的に発現される。

任意の異常オーブンリーディングフレームがRESエレメントに適応される。本発明の状況において、これは発現を所望する任意の遺伝子のタンパク質および任意の複数レポーター遺伝子（または選択マーカー遺伝子）を意味する。複数のタンパク質の発現が達成され得ても、GFP発生を通じての抑制モニタリングを作りう。

13. gfpベクター

アデノウイルスgfp（M74）は、ヒトに対して非致病性で、高親度の組込みを有し、そして非分離細胞に適応し得るので、ヒト遺伝子療法のために魅力的なベクター系である。従って、M74は、組成性および効率性の両方の哺乳動物細胞に遺伝子を送達するために有用である（Bazzykis, 1992）。最近の研究は、M74が

ない天板に存在する細胞と区別される。従って、操作細胞は、人の手によって導入された遺伝子を有する細胞である。

培養において連続的に増殖する樹立された細胞株は、本発明の実施において使用される細胞の主要を形成する、特に使用のために選択されるこのような哺乳動物細胞株の例は、Vero細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、COS-7のよう COS細胞、R138、R136、R137、R138、R139、R140、R141、R142、R143、R144、およびR145細胞である。

初代細胞株はまた、本発明での使用のために選択される。初代細胞株は、動物またはヒト細胞から取り出された細胞であり、そして制限された時間の細胞培養において生存する。このような細胞はしばしば操作され（例えば、右記文献を参考するため）、次いで細胞が本発明の動物細胞に導入される。この技術は、しばしばエクスピリエンスを有する。

全ての脊椎動物の初代細胞が、他の細胞に反応しても反応されなくても、本発明者中に示されたヒト細胞細胞での使用のために考慮される。これらは操作のためにのみ、骨髄細胞、神経細胞、肺上皮細胞および腎細胞を含む。

発現、分離または別の方法で治療薬または所望の因子を動物またはヒト細胞に導入するように選択されている他の細胞中のヒト細胞が有る。本発明者からそのように示された細胞は、免疫学的適合性動物からの細胞、免疫学的に改変または操作された細胞、宿主動物における半導性デバイス中に導入された細胞、およびいっそうの細胞には、宿主動物中で一時的生存を有するように導入される非改変細胞であり得る。

もちろん、本発明がより直接的な遺伝子療法における使用のためによく適応するように、本発明に記載されるような任意の細胞の細胞的操作がヒト化された遺伝子を含むことを考慮される。このような細胞のうち、本発明中に使用される「遺伝子宿主細胞」の記載の範囲に入ると考慮される。これは、遺伝子を獲得する儀式（例えば、トランسفエクション、感染など）に關わらず、ヒト化された遺伝子またはベクターの1つ以上のコピーを含む動物またはヒト細胞中

の任意の細胞を含む。疾患細胞、欠損細胞および通常細胞が全てこの様式において本発明中に包含される。

13. 遺伝子のクローニング

他の生物からのDNA遺伝子がクローニングされ得ることがまた示される。これらは、改変されたまたはそうでなければ所望の実体のない特性を有し得、大いに本発明に競合化され得る。

別の生物からのDNA遺伝子をコードするDNA分子のクローニングは、單に、特異的遺伝子を導入、そしてDNAの該部分から区別して導入するためにDNAライ

プライマーをスクリーニングすることを要とする。このようなクローニング手順の最終の工程は、適切な操作ライブライマーのスクリーニングである。スクリーニング手順は、選択スクリーニングプロトコル（例えば、GFPタンパク質に対して指向された抗体を用いるか、または蛍光に答える活性アッセイ）であり得る。

あるいは、スクリーニングは、公的のSanger法の部分を考慮して設計されたオリゴスクレオチドロープのハイブリダイゼーションに基づき得る。このようなスクリーニングプロトコルの操作は当業者に周知であり、そして科学文献に詳細に記載される（例えば、Sambrookら、(1989)、(本発明書中に参考として掲載される）。

以下の実施例は、本発明の最も深い実施形態の実証を含む。以下の実施例に示された技術は、本発明の実施においてよく使用するとして本発明者らに見出された既存の技術を表し、従って、この実施例のために最も深い実施形態を構成すると考えられることが当業者に理解されるはずである。しかし、当業者は、本発明に従うとして、開示される特定の実施形態において多くの変更がなされ得、そして本発明の精神および範囲から逸脱することなくお同様または類似の結果を得ることができることを理解するはずである。

実施例

1. 対象細胞におけるクラゲ細胞の表現型

本実施例は、293細胞におけるトランسفエクションおよび発現においてクラ

ゲンp10レポーター遺伝子を発現する細胞株M1 (M1) を使用する試みを記載する。

野生型gfpを発現するM1ベクターおよびM1の產生

アデノウイルス (AdV) は、現在、異なる細胞型に遺伝子を送達するベクターとして広範に用いられている。AdVの使用には多くの利点が存在し、例えば、明白な病原性の存在、ビリオンの高生産度、宿主特異的転写、遺伝子の長周期、ならびに吉野染色体複数および細胞周期への比較的の非依存性が挙げられる。

M1の1つの欠点は、ウイルス内部の規定されたパッケージサイズであり、これは5,000スケレオチドを超過しない。現在利用可能なほとんどのAdVベクターは、あるレポーター遺伝子または別のレポーター遺伝子、すなわち *lacZ* ガラクトシダーゼおよびオマジンホスホトランスフェラーゼを有する。これらはのレポーター遺伝子は宿主とも有するにかぎり、AdVゲノムの限られたスペースのあまりに多く占有する。これらの遺伝子複数に対する輸出プロトコルは、堅くなくかつ煩わしい。

本セクションは、組換えAdVベクタープラスマド、pTBS-IV (図2)；これはクラゲgfp遺伝子およびneo遺伝子の両方を保有する) の構造を記載する。プラスマドTBS (Lardickら、1994) をgfp10コード配列の供給源として用い、そしてこの遺伝子を即時型プロモーターの制御下に配置した。ベクター產生の模式図を図2に示す。

予想には、組換えAdVベクタープラスマド、pTBS-IV (Lardickら、1994) をSalIおよびEcoRIで消化し、XbaIフラグメントで末端を埋め、そしてEcoRIリンカーベクターを接合した後、pTBS-IVをpCR2.1 (Clontech) のSalI部位にサブクローニングした。次いで、得られたプラスマド (pCNGTと称する) をテンプレートとして用いて、CITプロモーター、SV40イントロン、gfp10 cDNA、SV40ポリA (およびSV40ポリA) を含むする内部gfp10フラグメントを除去することによってTはねおよびTはねのpTBS-IV部位をTはね部位に変換することにより改変されている。得られたプラスマドをpTBS-IVと命名した。

ポリオマウイルス由來の誘導チミジンキナーゼ遺伝子プロモーターおよびエンハンサーによって駆動されるmRNAs遺伝子カセットを、プラスマドpEneo (Stratagene) をSalIで剪断し、Klenowで末端を埋め、SalIリンカーベクターを接合し、そしてSalIで改変することによってこのプラスマドから改変した。neoカセットを含むするpTBSフラグメントをゲル電気泳動によってTはねおよびTはねのpTBS-IV部位をTはね部位に変換することにより改変されている。得られたプラスマドをpTBS-IVと命名した。

組換えAdV (AdV) ウィルスを產生するために、293細胞をpTBS-IVおよびヘルバープラスマドpCMV (末端反復を有しないpTBS-IVを保有する) (McCartyら、1991) で同時にトランسفクトした。同じ細胞にまた、感染後24時間 (a.u.) 10倍アデノウイルスを感染させた。

グナルに直接的である) は、SalI部位突端部を含んでいた。ウシ成長ホルモン (hGH) 遺伝子のポリアデニル化シグナルを、テンプレートとしてプラスミドpCMV (CMV) を用いた別のPCR反応において増幅した。この反応における上級プライマーは、SalI感受性配列突出部を含み、そして下級プライマーはpTBS-IV部位を含んでいた。

1.3.アガロースゲルにおけるPCR反応の精製の後、それぞれのフラグメントをSalIで消化し、そして取扱されたSalI末端によって互いに連結させた。連鎖動物をゲル処理し、そしてpTBS-IVで消化した。160bpSalI-PstIフラグメント (AdV末端反復を含むする) を、プラスミドpTBS-IV (Ryanら、1995) からゲル精製によ

って精製した。このフラグメントを、以前に記載されたプラスミドpTBS-IV (SalI-egfp) 、[即ち] に由来するpTBS-IVにサブクローニングした。次いで、それをpTBS-IV感受性カセット (pTBS-IVモーター、SV40イントロン、gfp10 cDNA、SV40ポリA (およびSV40ポリA) を含むする) の両端間に連結させた。

次いで、連結部位をSalIで切削し、そしてプラスミドpTBS-IV (Stratagene) にサブクローニングした。これは、PstIリンカーベクターを接合し、そしてボリリンカーベクターを有する内部gfp10フラグメントを除去することによってTはねおよびTはねのpTBS-IV部位をTはね部位に変換することにより改変されている。得られたプラスミドをpTBS-IVと命名した。

ポリオマウイルス由來の誘導チミジンキナーゼ遺伝子プロモーターおよびエンハンサーによって駆動されるmRNAs遺伝子カセットを、プラスミドpEneo (Stratagene) をSalIで剪断し、Klenowで末端を埋め、SalIリンカーベクターを接合し、そしてSalIで改変することによってこのプラスミドから改変した。neoカセットを含むするpTBSフラグメントをゲル電気泳動によってTはねおよびTはねのpTBS-IV部位をTはね部位に変換することにより改変されている。得られたプラスミドをpTBS-IVと命名した。

組換えAdV (AdV) ウィルスを产生するために、293細胞をpTBS-IVおよびヘルバープラスマドpCMV (末端反復を有しないpTBS-IVを保有する) (McCartyら、1991) で同時にトランسفクトした。同じ細胞にまた、感染後24時間 (a.u.) 10倍アデノウイルスを感染させた。

細胞を3回凍結および解凍し、56°Cで30分間GFPを熱不活化させ、細胞片を凝心沈殿させ、そして毎時間200,000回転で30分ローターで形成されたGFPグリジエント（1.4kg/ml）を溶してウイルスを精製することによって、粗挽丸MTを毎時開栓に投擲する。グリジエントを分離し、そしてホモジナイトリルによって測定した。1.3kg/mlと1.4kg/mlとの間の密度を有する部分をゾルトし、そしてMSB液地に対して4時間透析した。MT液を透析中心アセト（McLaughlinら、1998）によって測定した。

野生型gfpの低レベル発現

pTkg-EP（プラスミドpT1を293細胞にトランスフェクトさせた場合、GFPを発現

する細胞の平均数は通常5%未満であった（図3）。さらに、粗挽丸MTを感染させた293細胞（同一の宿主発現カセットを保有する）を、GFP性であると反復して評価した。これらの2つの例発現の唯一の差異は、外見上は、各細胞に透析されたGFP mRNAの量であった。トランスフェクションの間、既存またはさらに以下のプラスミドコピーが追加され、一方、McLaughlin（1本調）の条件下での感染は、单一コピーのみの遺伝子を透析する。

従って、pTkg-EP細胞がChaffieら（1998）によって最初に記載されたように、成長液およびヒト細胞で発現した場合に乏しいレポーターであることを本発明者は見出した。明らかに、哺乳動物およびヒト細胞におけるGFPの発現が感度が得られる新規技術が必要とされていた。

実験例

ヒト細胞においてGFP発現を増大させる試み

本実験例は、哺乳動物およびヒト細胞においてGFPの発現を増大させる試みに使用し得る種々の方法を記載する。

所定のプロモーターの弱音下にある所定の遺伝子座の量を増加するいくつかの可能性がある方法が存在する。このような方法の1つは、タンパク質/遺伝子互作用および融合を通してプロセンシング/プライシング技術にプロモーターを配置するイントロン配列を導入することにより遺伝子の安定性を増大させるように試みることである。

本発明者らのGFP発現カセットは、SV40長鎖連子16S/19Sスプライスドナー/スプライスアクセプターサイトを含んでいた（図1B）。この配列は、文献中でしばしば用いられるが、その効果は可変的であり、そして遺伝子特異的である。従って、本発明者らは、この接合単純ではヒト細胞におけるGFP発現を強調には適切ないと考えた。

外来タンパク質を他のタンパク質またはポリペプチドドメインに融合することによってその外来タンパク質の安定性を増大させることもまた考えられる。これについては、第2のコード領域へのクラグ配列の組合を可能にするベクターが開発可能である。しかし、本発明者らは、これがGFP配列の矢印を適切に強調す

ることは考えていなかった。

タンパク質収率を増大させる別の可能性のある方法は、真核細胞の細胞の開始を基にする配列を導入することによって翻訳効率を最大化することである。このような配列の1つは、Kozak開始コマンドを直前に先行するKozakコンセンサス配列（Kozak, 1981; Kozak, 1987）である。さらに、AUGコドンの約14スケレオチド後に位置する最適に配置されたステムループヘアピン構造が用いられる（Kozak, 1990）。

しかし、pTkg-EPの上液に配置されたKozak配列が翻訳効率を最大化させなかった研究が知られている。従って、Kozak配列の一般的な有効性、およびgfpと組み合わせてKozak配列を使用する先行文献の明確な不確にも関わらず（例えば、Takemoto和Kozak, 1974; Kozak, 1977）pTkg-EPのKozak配列と後の導入は、より立てて成功しなかったようである。

本発明者らは、細胞が吸収されたままであるので、Kozak配列によって授与され得る開始におけるいかなる導入もpTkg-EPにおいて顕著な増大を生じないと考えた。翻訳効率問題に取り組むことに関する別の方法とKozak配列との組み合わせにより利点が生じ得ると考えられていたのにも関わらず、この欠点がKozak配列単独の有効性を強く疑問とされるに至った。

実験例II

ヒト化GFP遺伝子およびベクターの構造

哺乳動物細胞におけるGFP発現を改善する前述のよく用いられる技術の失敗に因らしてみて、本発明者らは、このような細胞におけるGFPの低発現の重要な理由の1つが細胞表面におけるGFPの不適切な局所化であると評価した。本実験例は、哺乳動物およびヒト細胞における増大したGFP発現を得るために使用するためのヒト化GFPの設計を記載する。

タンパク質の低発現は、所定の細胞における細胞膜の乏しい表面活性効率から生じ得る。例えば、ヒト細胞表面は、所定のセットのイソ型を有する（これは他の種と異なる）によって特徴づけられる。実際に、直接および直接遺伝子の側面におけるアレルコドンの過剰が強く知っていることが一致に知られている。また、分離

子的に遺伝子の側面または遺伝子間（同一タンパク質をコードする遺伝子間）の相違に知れず、同一または分割型的に開拓した生物の異なる遺伝子の間でコドン用法において明白な相違が存在する（Granthamら, 1991; Kozak, 1990; Ikemuraら, 1981）。

生物間のコドン選択パターンにおける差異は、イソ型を含む実験の範囲における差異およびアントコドン半饱和度の変更スケレオチドにおける差異に起因する（Ikemuraら, 1981; Ikemuraら, 1982）。両種コドン選択は、合成されたタンパク質の特性に影響しないが、遺伝子の発現度に影響し得る（BennetzenらおよびBlei, 1987; Ikemuraら, 1981; Ikemuraら, 1981; Ikemuraら, 1982）。コドン用法と遺伝子との間の相違の程度は、個々の遺伝子の発現レベルに関連することが見出されている。

従って、本発明者らは、クラグpT1のコドン使用頻度を調査し、そして1490のヒト遺伝子の合計のコドン使用頻度の平均（Ikedaら, 1998）と比較した。pTkg-EPの配列の分析により、このクラグ遺伝子のコドン使用頻度がヒトゲノムにおいて広く用いられているものとは全く異なることを示した。例えば、クラグpT1（配列番号2）の18, 63, 125, 171, 195および236位のLeuアミノ酸残基；228位のSer；ならびにAsp, IleおよびThr位のValは、ヒト遺伝子（配列番号1におけるコドン）ではほとんど全く用いられないトリプレットによってコードされている。残りのアミノ酸もまた、細胞ではないがヒトとは異なる留めを示す。

従って、本発明者らは、クラグGFPをコードする成功がヒト細胞系において伝導率で確認され、蛍光の発現のためには不十分な量のタンパク質しか生産しないと考えたので、本発明者らは合成バージョンのクラグpT1を設計した。この合成（またはヒト化）バージョンのpTkg-EPでは、ヒトゲノムにおいて優先的に用いられるコドンを導入し、本来のpTkg-EPに存在するそれなりコドンはより少ない頻度で用いられるコドンを置換した。

実験例II

ヒト化GFP遺伝子およびベクターの構造

本実験例は、実験例Iに記載される分析の結果を用いて、哺乳動物細胞およ

びヒト細胞における増大した発現において使用するヒト化GFPの生成を記載する。

まずまず各配列を、pTコドンにおいて、アミノ酸配列（図1）を変更することなく作製した。さらに、pTkg-EP中のGFPタンパク質の開始コドンの配列を改変して、Kozakコンセンサス配列を生成した。また、コドン跡を、Chaffieら（1998）に記載のように、アルギニンと対照される、野生型グルタミン残基（Fraschら, 1992）に元に戻した。この構造物（pTkg-EPと称される）を、以下のように開拓した。

pTkg-EPを、相互にブリーディングする合成オリゴスケレオチド（図1を参照のこと）をアセンブリすることにより合成した。pTkg-EP遺伝子を認識感度の2つのオブジェクトに分け、そして2つの対のオリゴスケレオチドを合成した。各対は、短い範囲の直線（図3, 下線部）を有する2つの直線オリゴからなり、一方はセンス鎖をコードし、他方はアンチセンス鎖をコードする。アニーリングおよびSequencingによる合成の後、対1および2をEcoRIで消化し、一方、対3および4をKpnIで消化した。次いで、消化液を、2つの割合の反応で混合した：オリゴ2を2へ、そしてオリゴ3を4へ。所液の量の最終濃度を、5%ボリアクリルアミドゲル上で、非変性条件下で精製した。次いで、両側はフラグメントを、EcoRIで消化し、そして互いに連結した。

最終液を、一方のオリゴスケレオチドを使用して、PCR反応において増殖

した。このオリゴスクレオチドは、ヒト化 GFP cDNAに部分的に相合いであります（以下を示すこと、太文字）、そしてクローニングのための制限部位を含む、XbaI、およびNotI（以下を示すこと、下線部）を含む。上流プライマー（Forward primer）センサス配列（或は、1987年を含む）の配列および下流プライマーの配列を。

それでは：

5'-GTCATATCTTGGATCTGGGAACTCTCTGCGCTGAGCTG-3' (配列番号 9)

5'-CCCGCTTCTTGGCGCTCACTTCTGCGCTGCTGAT-3' (配列番号 10)

NotIおよびNotI（以下）でのPCR産物の評価後、NotI フラグメントを pRS314 (以下) 中にクローニングし、そして配列決定した。いくつかの独立クローンを準備し、そして配列決定した。これらのクローンは、コード配列中に、おそらく PCR 増幅の間に生じたかまたはオリゴスクレオチド中に存在したかのいずれかである変異を有した。次いで、これらのクローンの一部を一斉にスプライスして、野生型アミノ酸配列を含む最終的な遺伝子を作成した。得られた新規物を pRS-GFP1 と命名し、そしてそれは野生型 GFP のコード配列を含んだ。

pTgs-EP1 を構築するために、本発明者は、pRS-GFP1 (野生型) の NotI フラグメントで pRS314 (以下) の NotI フラグメント（同上）を連結した。

組換え AAV-EP1 を作成するために、293細胞を pTgs-EP1 およびヘルバーブラスマド pRcM5 (末端配列を有しない) 用いて AAVゲノムを保有する状態 (a. a. 1. 1990) で同時トランスクレクションした。また、同じ細胞を、アデノウイルスで、感染多度 (a. a. 1. 1990) で感染させた。

組換え AAV を、6時間後に、細胞を 3 回洗浄および離析し、細胞を 30 分間、56°C で熱不活性化し、細胞懸液を透心沈殿し、そしてウイルスを、SP41ローターにおいて 4時間、200,000 g で透心した (G25配列 (40 g/ml) によって蓄積することにより、採取した。この勾配を分割し、そして密度を透析率測定器により決定した。1.38~1.42 g/ml の間の密度の割合をブールし、そして透析率測定器に対して 4時間透析した。AAVカクテルを、感染中心検定 (McLaughlinら、1990) により決定した。

実施例 V

ヒト化 GFP 改変体および pRSベクターの発見

本実施例は、野生型タンパク質と異なる特性を有する GFP タンパク質改変体をコードする。さらなるヒト化 GFP 配列の生成を記載する。改変体はまた、哺乳動物細胞およびヒト細胞において発現が増大される。

2つの変異体を、pRS-GFP1 パックグラウンド中に、部位特異的 PCR 改変法により構築した。系統のヒト化変異体は、Ser169からThr169への置換を記載したBlelloch (1995) により報告されるタンパク質配列を反映する。この変異は、元のクランのコード配列の状況における蛍光の生成を強化した。この変異がヒト化 GFP-EP1

102位の状況においてよりいっそう有効であり得るという推論により、本発明者はこの点変異を pTgs-EP1 パックグラウンド中に再生成して、プラスミド pTgs-EP1 を生成した。

増強された蛍光を提供するさらなる工程のように、さらなる変異がなされて「増強された」緑のバージョンの GFP を生成した。Ser169からThr169への置換に加えて、Leu164をPhe64に置換した。従って、増強された GFP は、Pheをコードする TCC を GFP に変換した場合、Phe64の代わりにLeu64により置換され、そしてまた TCC によりコードされるSer169をLeu169によりコードされるThr169に変換した場合、結果された

また、ブルー蛍光を生じる別の点変異 (Tyr66からTrp66へ) (Blelloch, 1990) をヒト化 pTgs-EP1 のパックグラウンド中に構築して、ベクター pTgs-EP1 を生成した。

「増強された」緑のバージョンを、Tyr66からTrp66への変異に加えて、Tyr145からPhe145へのさらなる変異により作製した。塩基変換は、それぞれ、TAAからTTG および TATからCTT であった。

GFP の改変バージョンは次節に適用され、特に異なる色の増強されたバージョンで使用される。改変 GFP および GFP (ブルー蛍光タンパク質) は、或者しない異なる吸起スペクトルおよび発光スペクトルを有することにより、独立した検出を可能にする。2重タグ化は、2つ以上の蛍光標識タンパク質のいずれかを発現す

る細胞の迅速かつ特異的な同定を可能にする。このような方法は、例えば、植物スクリーニング、または構造プロモーターの制御下に配置された目的遺伝子に影響を及ぼす薬剤の分析に適用可能である。適用はまた、種々の細胞の下での透析下発現、またはインヒビターにより影響を受けるような遺伝子表現の研究を含み得る。

変異体を作製するために、PCRを用い、テンプレートとしての pTgs-EP1 およびゲーのオリゴを用いて、以下に記載のように行った：

①：透析について：

②：上流プライマー：実施例 IV に記載：

③：5'-GTCATATCTTGGATCTGGGAACTCTCTGCGCTGAGCTG-3' (配列番号 1)

④：透析について：

⑤：上流プライマー：実施例 IV に記載：

⑥：5'-GTCATATCTTGGATCTGGGAACTCTCTGCGCTGAGCTG-3' (配列番号 1)

⑦：透析について：

⑧：変異体を作製するために、PCR 産物を pRS314 および pTgs-EP1 で構築し、そして pRS-GFP1 のそれぞれのフラグメントを連結した。配列を、NotI フラグメント (実施例 IV に記載) を配列決定することにより確認した。この配列は、pTgs-EP1 中の NotI フラグメントが置換されたものである。

これは発現に影響を及ぼすと考えられていないが、ヒト化 GFP の変異体において、本発明者は、コドン読みを、Blelloch (1990) により記載されるように、アルギニンと対照される野生型グルクニン残基 (Prashiterら, 1992) に再構成した。

pTgs-EP2 または pTgs-EP3 を構築するために、本発明者は、pRS-GFP2 (Blelloch よりまたは pRS-GFP3 (Blelloch) の NotI フラグメントのそれぞれで pTgs-EP1 (同上) の NotI フラグメントを連結した。PCR増幅を行なった任意のDNAフラグメントを配列

決定して、元の配列との同一性を確認した。

pTgs-EP1 を構築するために、プラスミド pRS2-1 (Blelloch, 1993) の EcoRI 部位を、EcoRI での消化、5' 突出のクレノウボリメラーゼによる末端、および NotI リンカーニの連結後で NotI 部位に変換した。次いで、5'端部の NotI フラグメント (ボリリンカーおよびアミポリオウイルスの内部リボソーム進入部位 (IRE) からなる) と、pTgs-EP1 (同上) の NotI 部位の 1 つにサブクローニングした。

組換え AAV は AAV ウィルスを生成するために、293細胞を pTgs-EP1 または pTgs-EP2 でトランスクレクションし、そしてヘルバーブラスマド pIM45 (末端配列を有しない) AAVゲノムを保有する McLaughlinら, 1990 で同時トランスクレクションした。

また、同じ細胞を、アデノウイルスで、感染多度 (a. a. 1. 1990) で感染させた。

組換え AAV を、6時間後に、細胞を 3 回洗浄および離析し、細胞を 30 分間、56°C で熱不活性化し、細胞懸液を透心沈殿し、そしてウイルスを、SP41ローターにおいて 4時間、200,000 g で透心した (G25配列 (40 g/ml) によって蓄積することにより、採取した。この勾配を分割し、そして密度を透析率測定器により決定した。1.38~1.42 g/ml の間の密度の割合をブールし、そして透析率測定器に対して 4時間透析した。AAVカクテルを、感染中心検定 (McLaughlinら, 1990) により決定した。

実施例 VI

ヒト化 GFP の用大した発現

この実施例は、293細胞におけるヒト化 GFP の発現により生じた、GFP の増大した発現を記載する。

元のクランの配列とヒト化 GFP 標基物の発現効率とを比較するために、本発明者は、pTgs-EP1、pTgs-EP3、または pTgs-EP2 およびプラスミド配列を用いて、種々の PCR 測定で 293細胞をトランスクレクションした。次いで、トランスクレクションした細胞を、トランスクレクションの 3 時間後 PMSF によって凍結した (図 3)。

蛍光をモニターするために、GFP-標識した rAAV-GFP2 を用いて、10%の 1.1% 2% ピリジンを感染させた。感染後 3 時間で、透析モール (CHROMA Filter Cube #41014 G-EP-10 (450/-25 nm で吸収)) を使用して蛍光強度で発現を追跡した。あるいは

組換え GFP アデノウイルスの構築および使用

この実験例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化 GFP 連鎖を発現する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化 GFP 発現における異なるベクター系の使用を示す。

アデノウイルスシャトルベクター pE127 (図 2B) を構築するために、質プラスミド pJ17 と Sal I で部分的に消化し、次いで Sal I で完全に消化した。GFP プロモーター、イントロン、IRES エレメント、GFP cDNA、およびボリ UG 部分からなる組換えベクターを、アガロースゲルから単離した。このフラグメントを、Sal I (および Sal I) で消化した pAdBlipA (Bentil, 1994) にサブクローン化した。組換えアデノウイルスを作成するために、シャトルベクター pE127 (Bentil, 1994) および Ad ベクター pJ17 (McGregor, 1988) を、供給者 (Microbix Bio

57

Systems Inc.) によって複数される手順を使用して、293細胞に同時にトランスクレクトした。組換えルイボス含有するブラークを、典型的な細胞変性発現 RFP を示す群やかなグリーン細胞の群について、エピ發光 (epifluorescence) 下での視認的選択によってクリーニングした。組換えルイボスと pAdBlipA と名付け、そして細胞的な校査を用いて確認させた。

pE127 を、アデノウイルスゲノム pJ17 に組み、1.2% の珪藻を含有するプラスミドとインビスで組換える場合、RFP を含む、そしてそれを発現する組換えアデノウイルスが生成された (図 8)。GFP レポーター遺伝子は、組換えルイボスの組み換えを可能にした。選択細胞群によって調べた場合、RFP の組換えルイボスは、典型的なアデノウイルス GFP を示す群やかなグリーン細胞の密集した (compact) 群から構成されたが、残りの組換えルイボスは、グリーン細胞を含まなかつた。他のルイボスに対する残りのルイボスの比率は、pE127 シャトルプラスミドと pJ17 ドナーブラスミドとの組合せを使用する場合、約 1:2 であった。従って、GFP 選択の比率は、クリーニングプロセスを有意に単純化した。

実施例 5 モルモットの光セレクター細胞の構築

この実験例は、ヒト化、ifik、cDNA の発現、および分化した哺乳動物細胞におけるレポーター遺伝子としてのその使用を記載する。

RMV-GFP1 を、モルモットの精巣を感染させるために使用した。モルモットを、ケタミン (50 mg/kg 体重) およびキシラジン (8 mg/kg) の混合物の筋肉内注射によって麻酔した。それらの組合、2.5% のフェニレフリン (Neo Sympathine) および 0.5% のトロピカミドで遮断させ、そして局所麻酔 (プロパラカイン 0.1%) を内腔に投与した。前筋膜の穿刺により、圧迫を下げた。20 ゲージ針を側臍板の視認的な筋群の下で筋子体中の毛髪体筋に挿入し、そして 25 ml ID RMV-GFP1 (2.5 × 10⁶ の感染性粒子) を注入した。引き、発光および炎症部位についての観察によって検査した。

注射後 24 時間で、脂肪を剥離し、そしてケタミン 0.1% の筋肉内注射し、続いて、

ペントバルビタールナトリウムを腹腔内に投与致して安樂死させた。ついで、動物を、0.1% の PBS 中の 4% のバラホルムアルデヒドを使用して固定した。頭を摘出し、そして水晶体および角膜を取り除いた。精巣および臍子体を、一塊としてさらに固定した。次いで、臍膜を、7.5%、15%、および 30% のスクロースに浸漬し、そして 20~25 分の間で固定切削した。組織標本を、ソルオロセイン固定/脱脂フィルターを用いて、Ito の共焦点顕微鏡上で可視化した。

GFP cDNA の、インビス系におけるレポーター遺伝子としての有用性を試験するため、本明細書は、2 種類の作成の RMV のモルモットの筋子体に、RMV-GFP1 ウィルスを注射した。筋の組織切片は、特異節細胞 (筋子体注射に最も近い筋) の細胞において優先的に、弱い GFP 発光を明らかにした。さらに、いくつかの水平筋筋は、GFP 発光を示した。GFP2 の最も強い筋筋は、側臍板上皮 (RPE) の細胞において見られた (図 9A、図 9B、図 9C、および図 9D)。

RMV-GFP1 について、試験した各組織切片は、発光を見る RPE 細胞を有していた。RPE 細胞における GFP プロモーター活性性発現に対するこの優先は、既に注目されている (Bentil, 1994; Bentil, 1994)。コントロールの左耳による組織標本の試験は、RPE の色素颗粒中の自己発光を除いて、細胞特異的放出を明らか

にしなかった。モルモット筋子体筋への RMV の投与が筋子体筋内 GFP 発現を誘導するという事実は、RMV が 100~200 nm の厚さの神経細胞をトーバス (tunica) に通過することを示した。この特徴は、RMV 粒子の小さい直径に因る。

実施例 6 pGEELANTEN-1 ベクター

この実験例は、pGEELANTEN-1 と呼ばれるために有用なベクターの作成を記載する。

pGEELANTEN-1 を作成するために、以下のプロトコルを使用した。pSPORT2 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD から入手可) を、Prulissel (Prulissel) で消化した。末端を、クレノーフラグメントの作用によって平滑にした。より大きなフラグメントをゲル精製した。

次いで、pGEELANTEN-1 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD から入手可) を、Earl および Ringer で消化した。末端を、T4DNAPolimeráz の作用によって平滑にした。より小さなフラグメントをゲル精製した。2 つのフラグメントを連結し、そして得られたプラスミドを RAD-TEMP と名した。

RAD-TEMP を、Earl で部分的に消化し、そしてクレノーで処理した。DNA を自己遮断させ、そして得られたプラスミドは、マルチクローニング部位 (MCS) に 1 つのみの Bam HI 領域を有した。MCS を、Earl および Ringer で DNA を切断し、そして以下の組合せ (Earl-Bam HI-Earl-Asal-Bam HI) および (Earl) を有する新しいオリゴを連結することで改変した。このプラスミドを、pGEELANTEN-1 と名した。

pGEELANTEN-1 を、Earl および Ringer で消化し、クレノーフラグメントで処理した。GFP プロモーターは pCMV βgal 由来であった。プロモーターは、クレノーフラグメントで平滑にした Sph I-Sph I フラグメントにあった。DNA を自己遮断し、そして得られたプラスミドを pGEELANTEN-1 と名した。

pGEELANTEN-1 を作成するために、pGEELANTEN-1 を利用した。pGEELANTEN-1 を Ringer で消化し、少量化アルカリ性ファーバーで処理した。DNA をヒト化 GFP と名した。

RMV-GFP1 について、試験した各組織切片は、発光を見る RPE 細胞を有していた。RPE 細胞における GFP プロモーター活性性発現に対するこの優先は、既に注目されている (Bentil, 1994; Bentil, 1994)。コントロールの左耳による組織標本の試験は、RPE の色素颗粒中の自己発光を除いて、細胞特異的放出を明らか

参考文献

本明細書中に示されるものに対して、何らかの手順的または他の手続を提供する程度まで、以下の参考文献が本明細書中に参考として詳細に使用される。

Adams et al., "Vector for using green fluorescent protein (gfp) as a reporter of gene expression and protein localization in mammalian cells", PCT/US 96/11326, Abstract #425, 1995.

Adams et al., In: *Fluorescent Probes for Biological Activity of Living Cells: A Practical Guide*, ed. Maxx, Academic, New York, pp. 133-143, 1993.

Adams et al., *Nature* (London), 340:694-697, 1992.

Adelman et al., *DNA*, 2:183, 1993.

Baichwal et al., "Vector for gene transfer derived from adeno DNA viruses: Transient and stable expression of transfected genes," In: Kucherlapati R, ed. *Gene Transfer*. New York: Plenum Press, pp. 117-148, 1985.

Bennet, J., J. P. Egan, D. Gao, R. Purvis, and A. Migeotte, "AdenoVirus Vector-Mediated *In vivo* Gene Transfer Into Adult Murine Retina," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35:2535-2542, 1994.

Bernstein, J.J. and J.D. Hall, "Codon Selection in Tissue," *The Journal of Biological Chemistry*, 277(5):3026-3031, March, 1992.

Bell, A.J., W. Hocken, L. Proven, and P.L. Greene, "An Efficient and Flexible System for Construction of AdenoVirus Vectors with Insertions or Deletions in Early Regions 1 and 2," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3802-3806, 1994.

Bitter et al., *Methods in Enzymol.*, 153:515-546, 1987.

Chaitin, M., Y. Tsu, G. Eustachio, W.W. Ward, and D.C. Prasher, "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression," *Science*, 263:902-905, 1994.

Chang et al., "Foreign gene delivery and expression in hepatocytes using a hepatitis B virus vector," *Hepatology*, 14:33A, 1991.

Cheng A.K., M.D. Hogen, W.W. Hämmerle, and E.J. Berns, Jr., "Integration of the Adeno-Associated Virus Genome Into Cellular DNA in Lymphoid Infected Human Dermal Fibroblasts," *J. Virol.*, 33:739-748, 1980.

Cochrane, K.E., T. Venkateswaran, D.M. Pringle, and P.R. Johnson, 1995. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Human Gene Therapy* 6:1229-1241.

Cody, C.W., D.C. Prasher, W.M. Weis, P.O. Prud'homme, and W.W. Ward, "Chemical Structure of the Fluorescent Chromophore of The Aequorea Green-Fluorescent Protein," *Biotechnology*, 12:212-218, 1994.

Cohen, "Naked DNA Paths Way to Vaccines," *Science*, 259:1651-1652, 1993.

Colberto-Garcia et al., *J. Mol. Biol.*, 138:1, 1981.

Couper et al., "A general method for the construction of recombinant vaccinia virus expressing multiple foreign genes," *Gene*, 55:1-10, 1989.

Cox et al., *J. Virol.* 67(7):3644-3657, 1993.

Cox et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5761, 1972.

Culver, K.W., Jones, L., Waddington, S., Intel, H., O'Gallagher, R.H., and Danos, E.M. *In vivo* gene transfer with attenuated vesicular-stomatitis virus vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 254:1558-1562, 1992.

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, chapter 8, 1993.

Cutter and Ward, 1993.

Dalgard and Yarchoan, "Designing sequence space to engineer proteins: Exponential ensemble mutagenesis," *Biotechnology*, 13:1549-1552, 1995.

Dalgard et al., "Extensive ensemble mutagenesis," *Protein Engineering*, 6:327-331, 1993.

Dalgard et al., "Anti-Edited Enrichment Matrices of the Green Fluorescent Protein," *Biotechnology*, 13:151-154, February, 1995.

Davis, W. M. Ward, and H. Hämmerle, "Dichloro Transcription Units for Gene Expression in Mammalian Cells," *Gene*, 126:347-349, 1993.

Dorf and Horigan, *Fluorescent Proteins and Applications Meeting*, Palo Alto, California (Abstract), 1993.

Ding et al., *FEBS Lett.*, 367:163-166, 1995.

Edmonson, J. *Anticancer*, 13:359-365, 1978.

Fitzgerald, T.R., Below, R., Owings, R.A., Afonso, S.A., Zeffris, P.L., and Carter, B.J. 1992. Gene expression from *in vitro* associated virus vector in mouse epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Biol. Phys.* 7:349-356.

Fitzgerald, T.R., Afonso, S.A., Cossel, C., McGrath, S.A., Below, R., Ota, H., Zeffris, P.L., Oggiano, W.B., and Carter, B.J. 1993. *In vitro* expression of the SV40 large T-antigen enhancer/constitutive promoter with an *in vitro*-selected virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:16613-16617.

Fitzgerald, T.R., Afonso, S.A., and Zeffris, P.L. 1994. Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am. J. Physiol. Cell Biol. Phys.* 11:317-321.

Fitzgerald et al., *Journal of Biological Chemistry*, 268:2254, 1993.

Fyson et al., "DNA vector: Protection immunotherapy by paramutual, monomeric, and polymeric immunotherapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:14378-14382, 1993.

Gao et al., *Zool. Amer.*, 68(1):15, 1991.

Ghosh-Choudhury and Graham, *Methods Mol. Biol.*, 140:96-103, 1997.

Ghoshayev et al., *In: AdenoVirus Protocols* (Ghoshayev, Y., ed) pp. 187-192, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1992.

Gibbons and Trost, "An algorithmically optimized combinatorial library screened by digital imaging spectrometry," *Biotechnology*, 10:1357-1361, 1992.

Goyal, "Gene transfer method for enhanced gene expression, stable transfection, and retrofection of suspension cell cultures," *Int. Coll. Biol.*, 51:183-189, 1983.

Graham and van der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of viruses in cultures of host cells," *Virology*, 32:455-467, 1973.

Gronlund, et al., "Codon Coding Usage and the Gcncine Hypothesis," *Nucleic Acid Research*, 21(1):19-32, 1993.

Gronlund, R., C. Gauthier, M. Orey, M. Jacobson, and R. Mericle, "Codon Coding Usage Is a General Strategy Modulated for Gene Expressivity," *Nucleic Acids Research*, 23(2):73-79, 1995.

Hahn, R., A.B. Cieffo, and R.Y. Tsien, "Improved gene fluorescence," *Nature*, 373:653-654, February, 1995.

Hahn, R., A.B. Cieffo, and R.Y. Tsien, "Wavelength Selection and Posttranslational Automation of Green Fluorescent Protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2381-2384, 1994.

Hermann, P.L., and Margolis, N. 1994. Use of adeno-associated virus as a recombinant DNA cloning vector: introduction of neomycin resistance into transmissible stable culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6464-6470.

Herrick et al., "Synthesis of hepatitis B virus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured FR277 cells," *J. Virol.*, 64:643-650, 1990.

Hirokawa, T., "Correlation Between the Abundance of Escherichia coli Transfer RNAs and the Occurrence of the Respective Codons in its Protein Codon," *J. Mol. Biol.*, 144:21-31, 1980.

Hirokawa, T., "Correlation Between the Abundance of Escherichia coli Transfer RNAs and the Occurrence of the Respective Codons in its Protein Codon: A Proposal for a Synonymous Codon Cluster that is Optimal for the E. coli Translation System," *J. Mol. Biol.*, 15:1339-1351, 1981.

Hirokawa, T., "Correlation Between the Abundance of Yeast Transfer RNAs and the Occurrence of the Respective Codons in Protein Codon: Differences in Synonymous Codon Cluster Patterns of Yeast and Escherichia coli with reference to the Abundance of Translating Transfer RNAs," *J. Mol. Biol.*, 138:577-597, 1980.

Hirokawa, T., "The Frequency of Codon Usage in E. coli Genes: Correlation With Abundance of Cognate tRNA," p. 525-534, In: S. Osumi et al. (ed.), "Structure and Evolution of RNA Polymerase, tRNA, and Ribosomes," University of Tokyo Press, Tokyo and Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1980.

Inouye and Nagai, *PLoS Lett.*, 34(1):277-280, 1994.

Jackson, J.L., M.T. Howard, and A. Kaminski, "The Novel Mechanism of Inhibition of Picornavirus RNA Transcription," *Trans. Prokres. Sci.*, 15:477-483, 1990.

Jeng, S.K., N.G. Kurniadi, M.L. Niedke, G.M. Duda, A.C. Peterson, and Z. Wimberger, "A Segment of The 5' Nucleotidase Region of

Encephalomyocarditis Virus RNA Directs Inserted Entry of Ribosomes During In vivo Translation. *J. Virol.* 52:2345-2353, 1982.

Das et al., "Particle Boundaries and Gene Insertion and Expression in Rat Brain Tissues," *BIO/TECHNOLOGY*, 11:467-502, 1993.

Kaplin, M.D., Leger, P., Samulski, R.J., Shi, X., Park, D.W., O'Malley, K.L., and Dusick, M.J. 1994. Long-term gene expression and phenotypic correction induced by adeno-associated virus vector in the mammalian brain. *Nature Genetics* 6:146-154.

Karlekar et al., *JACO*, 5:2377-2383, 1994.

Kashima et al., *Antivir. 26*:2373-2376, 1994.

Kudo, R.M., Shukla, M., Samulski, R.J., Zhu, Z., Hinter, C.A., McLaughlin, S., Miyazaki, N., and Rossi, J.J. 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus vector in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2211-2215.

Kosak, M., "At Least Six Mutations Preventing the AAV Integrase Codon Exchange Transduction in Mammalian Cells," *J. Mol. Biol.* 194:977-979, 1987.

Kosak, M., "Downstream Secondary Structure Facilitates Recognition of Integrase Codon by Eukaryotic RNAse," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3391-3395, 1990.

LePoer, D., Samulski, P., Winkler, S., and Park, A. 1992. Once inside host hepatocyte progenitor cells mediated by an adeno-associated virus vector. *Virology*, 182:463-464.

LePoer, C.A., C.R. Gashumba, and H.C. Chen, "Lytic Infection of KB Cells with Adeno-Associated Virus Type 2," *J. Virol.* 62:515-524, 1988.

Lukkowit, J.R., McNally, M.M., Ohanna, T.S., and Lewis, J.B. 1983. Adeno-associated virus: a vector system for efficient introduction and integration of DNA into a variety of mammalian cell types. *Mol. Cell. Biol.* 3:3583-3595.

Lodish, J. (1987). *J. Andrology* 18, 1.

Li, Y., M. Adesina, D. J. Ross, R.L. Burns, T.P. Doyle, B.J. Novak, and B.L. Davidson, "In vivo Transfer of a Reporter Gene to the Ratina Mediated by an Adeno-associated Vector," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35:2243-2248, 1994.

Liu et al., *J. Biochem.* (Tokyo), 118:13-17, 1991.

Lowy et al., *Cancer*, 62:317, 1988.

Lu et al., *J. Virol.* 68:2377, 1994.

McLaughlin, S.E., P. Chiu, P.L. Samulski, and N. Miyazaki, "Adeno-Associated Virus-Encoded Terminal Vector: Analysis of Protein Structure," *J. Virol.* 62:1963-1973, 1988.

Metting et al., *Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA*, Editor A. Vojtěch, Elsevier, Amsterdam, 1992.

Milner 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 168:1.

Mori, J.I. and J.W. Shattock, "Energy Transfer in a Bioluminescent System," *J. Cell. Physiol.* 77:313-317, 1971.

Mosca et al., *Biotechnology*, 12:2056-2063, 1994.

Muthukumar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2072, 1990.

Miyazaki, N., "Use of Adeno-Associated Virus as a Cloning Transfection Vector for Mammalian Cells," *Curr. Top. Micro. Assoc. Viral Expression Vectors* (N. Miyazaki, ed.), vol 15, pp 93-125, Springer Verlag, Berlin.

Mizobata, C. et al. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1602.

Nicolau and Stein, "Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells," *Biotechnol. Lett.* 7:1185-1190, 1985.

Lin, F., Zhu, S.Z., Chaper, L., Mischel, N.C., Howell, H.S., Baumgaert, H.E., and Brinster, R. 1994. Adeno-associated virus 2 mediated transfer and functional expression of a gene encoding the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 83(suppl. 1):304.

Miyazaki, R.G. and P. Strome, "Internal Initiation of Translation Mediated by the 5' Leader of a Cellular mRNA (see comments)," *Nature*, 353:98-94, 1991.

McCarty, D.M., M. Christensen, and N. Miyazaki, "Sequence Required for Coordinate Induction of Adeno-Associated Virus p19 and p40 Promoters by Rep Proteins," *J. Virol.* 65:2336-2345, 1991.

McGarry, W.J., D.A. Berndt, and F.L. Graham, "A Simple Technique for the Rescue of Early Region 1 Materials into Infective Human Adenovirus Type 5," *Pathology*, 16(3):414-417, 1984.

McLaughlin, S.E., P. Chiu, P.L. Samulski, and N. Miyazaki, "Adeno-Associated Virus-Encoded Terminal Vector: Analysis of Protein Structure," *J. Virol.* 62:1963-1973, 1988.

Metting et al., *Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA*, Editor A. Vojtěch, Elsevier, Amsterdam, 1992.

Milner 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 168:1.

Mori, J.I. and J.W. Shattock, "Energy Transfer in a Bioluminescent System," *J. Cell. Physiol.* 77:313-317, 1971.

Mosca et al., *Biotechnology*, 12:2056-2063, 1994.

Muthukumar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2072, 1990.

Miyazaki, N., "Use of Adeno-Associated Virus as a Cloning Transfection Vector for Mammalian Cells," *Curr. Top. Micro. Assoc. Viral Expression Vectors* (N. Miyazaki, ed.), vol 15, pp 93-125, Springer Verlag, Berlin.

Mizobata, C. et al. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1602.

Nicolau and Stein, "Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells," *Biotechnol. Lett.* 7:1185-1190, 1985.

Samulski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:1527, 1984.

Shi, S., Dinh, M., Tilday, M.K., and Park, S.O. 1994. Construction and replication of an adeno-associated virus expression vector that contains human β -globin cDNA. *Gene*, 137:279-282.

Pelizzetti and Sambrook, "Internal Initiation of Translation of Eukaryotic mRNA Directed by a Sequence Derived from Poly(A) RNA," *Nature*, 334:320-323, 1992.

Ponsse et al., *J. Mol. Cell. Biol.*, 24:2703-2716, 1982.

Pins, "GFP in Osteopontin," *EMBL 11402326-327*, August, 1993.

Poirier et al., "Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes integrated into mouse pro-B lymphocytes by transfection," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7181-7186, 1984.

Poos, D.L., V.K. Ehrhardt, W.W. Ward, P.G. Pradervand, and M.J. Crowley, "Primary Structure of the Agaricus Bisporus Oyster Fluorescent Protein," *Gene*, 111:229-233, 1992.

Ridgway, "Mammalian expression vectors," In: Rodriguez, R.L., Danzig, D.T., ed. *Vector: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Use*. Academic: Boston, pp. 467-492, 1982.

Riggs et al., "DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture," *Adv. Cell. Biol.*, 10:389-402, 1994.

Rivard et al., "Chlorase-green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells," *Current Biology*, 5(9):615-622, 1995.

Rivard, M. A., Sieghart, W., Yoshimura, K., Toyoyama, K., Toyoyama, M., Shiota, L. E., Pardi, J. K., Oishi, P., Stuifber-Persijn, L. D., Persijn, M., Atiles, S., Pardi, A., Leterrier, J.-P., and Crim, R. G. *Science*, 252:131-134, 1991.

Rivard, M. A., Yoshimura, K., Tropman, R. C., Toyoyama, K., Persijn, E. R., Deinhardt, W., Pardi, J. K., Oishi, P., Stuifber-Persijn, L. D., Persijn, M., Atiles, S., Pardi, A., Leterrier, J.-P., and Crim, R. G. *Cell*, 68:445-452, 1992.

Ryan et al., "Sequence Requirements For Binding of Rsp68 to the Adeno-Associated Virus Terminal Repeats," *J. Virol.*, 1992.

Sambrook et al. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Samulski, R.J., L.S. Cheng, and T. Shiek, "Helper-Plus Stocks of Recombinant Adeno-Associated Viruses: Normal Integration Does Not Require Viral Gene Expression," *J. Virol.* 63:3222-3226, 1989.

Samulski, R.J., Burns, R.L., Tsui, M., and N. Miyazaki, (1992) Cloning of AAV into pRS322: Insert of Insert from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2207-2211.

Samulski, R.J., Cheng, L.S., and Shiek, T. 1993. Helper-plus stocks of recombinant adeno-associated viruses: Normal integration does not require viral gene expression. *I. Virol.* 67:3223-3228.

Samulski, R.J., Zhu, X., Xiong, Z., Brock, J.D., Hoessner, D.H., Epstein, N., and Houser, J.A. 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosomes. *EMBO J.* 10:3541-3550.

Satohara et al., *Gene*, 102:47, 1994.

Shelling, A.N., and Saito, M.O. 1994. Targeted integration of transfected and infected adeno-associated virus vector containing the amphotericin resistance gene. *Gene Ther.* 1:165-169.

Silberman, G., "Properties of the Chromophore of the Agaricus Bisporus Fluorescent Protein," *FEBS Lett.* 104:229-232, 1979.

Silman et al., *Method Enzymol.*, 194:303-318, 1991.

Soyer, R.G., D.L. Ho, T. Ni, X. Xiao, R.J. Samulski, and N. Miyazaki, "Features of The Adeno-Associated Virus Origin Involved in Substrate Recognition by the Viral Rep Proteins," *J. Virol.* 67:6204-6204, 1993.

Stewart et al., 1990, *Gene*, Gene Transf. 2:263

Stuifber-Persijn, L. D., Leterrier, J., Chasse, J.-P., Persijn, M., and Bried, P., *Gene*, Gene Transf., 12:247-253, 1998.

Stuifber-Persijn, L. D., Malib, J., Persijn, M., and Bried, P., *J. Clin. Invest.*, 90:626-630, 1992.

Stringham et al., *Molecular Biology of the Cell*, 3:221, 1992.

Sutcliffe and Ward, *Photochem. Photobiol.*, 45:625, 1987.

Syrbuha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2026, 1982.

Teng et al., Nature, 356:152-154, 1992.

Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:639-643, 1984.

Torchilin et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2716.

Torchilin, J.D., West, M.H., Sandback, T., and Carter, R.J. 1984. A human papilloma virus-associated virus, as a eukaryotic vector: transient expression and expression of the polyomavirus gene for thymidine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 4:2073-2081.

Torchilin, J.D., Miller, J.L., Smith, M.G., and Carter, R.J. 1985. Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression and rescue of genes in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 5:2331-2350.

Tur-Kaspa et al., "Use of chimerapoxvirus to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes," *Mol. Cell. Biol.*, 6:716-718, 1986.

Ulmus et al., "Phenotype Protections Against Infection by Injection of DNA Encoding a Viral Protein," *Science*, 239:1743-1749, 1983.

Wada, K., B. Aoto, R. Torchilin, T. Iseki, and T. Iizuka, "Codes Unique Tabulated from the GenBank Genetic Sequence Data," *Nucleic Acids Research*, 16(Suppl.):223-2411, 1998.

Walsh, C.R., Mischak, A.W., Sandford, R.J., Brown, M.O., Miller, J.L., Young, M.S., and Lin, J.M. 1994. Phenotypic expression of Poxvirus genes in human hematopoietic cells with a recombinant adeno-associated virus vector. *J. Clin. Invest.* 94:1448-1455.

Wampler et al., *Microsc. Biophys. Acta*, 514:104-105, 1973.

Wing and Hanchett, *Nature*, 249:490-493, 1974.

Wing et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:4255-4260, 1989.

Ward and Barnes, *Stockesbury*, 21:4535-4540, 1992.

Ward, H.W., C.W. Cody, R.C. Hart, and M.J. Connoly, "Adeno-Associated Virus DNA Replication in vitro: Activation by Adenovirus Binding Protein/Rep 61 Protein Protease," *J. Virol.*, 63:6020-6027, 1989.

Ward et al., "Spectrophotometric Mobility of the Energy-Transfer Chromophores in Reticulin And Adeno-associated Virus Proteins," *Photochem. Photobiol.*, 31:611-615, 1980.

Ward et al., *Photochem. Photobiol.*, 31:803-808, 1982.

Ward, Jr. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications* (DeLuca and McElroy, eds.), Academic Press, pp. 235-232, 1981.

Wei, L.Y., Wu, P.Y., Sandford, R.J., and Torchilin, R.A. 1994. Expression of the human growth-hormone gene and myeloma A genes in murine and patient primary fibroblasts transfected by an adeno-associated virus vector. *Gene Therapy*, 1:251-258.

Ying, Q., Chen, F.Y., Thompson, J.P. 1994. Characterization of cell lines that indefinitely express the adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* 68:4847-4854.

Yoder, M.C., Kang, L.Y., Zhou, S.Z., Lee, T., and Schwartz, A. 1994. In vitro gene transfer in murine hematopoietic bone marrow stem cells modified by the adeno-associated virus 2-based vector. *Blood*, 83:477-478.

Yoshida, Schaffner, American, p. 56, May, 1993.

Whitton et al., *J. Virol.* 67:13468-13505.

Wigler et al., *Cell*, 11:221, 1977.

Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2547, 1980.

Wigler, J.A., Malone, R.W., Wilkins, P., Cheng, W., Amdal, G., Iml, A., and Pelizzetti, P. (1980) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Nature* 287:1465-1468.

Zhao, S.Z., "Imaging sequence space," *Nature*, 369:79-81, 1994.

Zhao et al., "Digital imaging spectroscopy for massively parallel sequencing of viruses," *Methods in Enzymology*, 246:723-745, 1995.

Zhao, S.Z., Brumley, H.B., Cooper, S., Hockington, M.A., and Schwartz, A. 1993. Adeno-associated virus 2 mediated gene transfer in murine hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* (NY), 21:928-933.

28

Zhou, S.Z., Cooper, S., Kang, L.Y., Sungiati, I., Heimfeld, S., Schwartz, A., and Schwartz, A.S. 1994. Adeno-associated virus 2-mediated high efficiency gene transfer into hematopoietic and mesothelial cells of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood. *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

Zhou, et al., 1995, *Science* 268:209-211.

記入者

(1) 一般的情報 :

(1) 出願人 :

(A) 名前 : ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ ファウンデーション,
インゴーリング ホール 223
(B) 本店 : グainesビル
(C) 国 : フロリダ
(D) 田 : アメリカ合衆国
(E) 代理人番号 : 14511
(F) 電話 :
(G) テレファックス :

(H) 代表者の名前 : ヒト化グリーン血タンパク質遺伝子および方法

(I) 記載面積 : 1.4

(I) コンピューター読み出し番地 :

(A) 基本番 : フロッピーディスク
(B) コンピューター : IBM PC互換用
(C) OS : PC-DOS/MS-DOS
(D) ソフトウェア : パテントインリリース II.0, バージョン II.30.0270

(J) 本件の出願データ :

(A) 出願番号 : 国 00/580,191

(B) 出願日 : 1996年1月12日

(K) 完成データ :

(A) 出願番号 : 国 00/580,191

(B) 出願日 : 1996年1月12日

○記載面積 1 の記載 :

(1) 記載面積 :

(A) 長さ : 117ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(E) 記載面積分 : 1

○記載面積 2 の記載 :

(1) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(2) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(3) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(4) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(5) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(6) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(7) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(8) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(9) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(10) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(11) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(12) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(13) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(14) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(15) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(16) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(17) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(18) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(19) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(20) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(21) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(22) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(23) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(24) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(25) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(26) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(27) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(28) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(29) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(30) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(31) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(32) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(33) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(34) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(35) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(36) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(37) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(38) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(39) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(40) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(41) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(42) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(43) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(44) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(45) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(46) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(47) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(48) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(49) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(50) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(51) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(52) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(53) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(54) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(55) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(56) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(57) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(58) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(59) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(60) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(61) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(62) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(63) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(64) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(65) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(66) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(67) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(68) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(69) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(70) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(71) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(72) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(73) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(74) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(75) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(76) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(77) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(78) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(79) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(80) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(81) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(82) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(83) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(84) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(85) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(86) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(87) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(88) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(89) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(90) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(91) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(92) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(93) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(94) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(95) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(96) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(97) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(98) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(99) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(100) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(101) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(102) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(103) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(104) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(105) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(106) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(107) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(108) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(109) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本幅
(D) フォトゾーン : 旗頭状

(110) 記載面積 :

(A) 長さ : 133ミリメートル
(B) 幅 : 8ミリメートル
(C) 高さ : 1本

Diagram illustrating the construction of a recombinant vector:

Components and Assembly:

- pCMVβ:** Contains a 3530 bp insert with *Ncol* sites at the ends. It is joined to TUN65 at the *Ncol* sites.
- TUN65:** Contains a 700 bp PGP insert with *Apel*, *EcoRI*, *Ncol*, and *Ncol* sites.
- T4-DNA:** Contains *Ncol* sites at the ends.
- pCMVgreen:** Result of joining pCMVβ and TUN65 to T4-DNA.
- pRC-CMV:** Result of joining pCMVgreen and T4-DNA.
- Final Vector:** Result of joining pRC-CMV and T4-DNA.

Restriction Sites and Insertions:

- Top Row:** *Bgl*II, *Eco*RI, *Kpn*I.
- CMV:** *Bgl*II, *Eco*RI, *Kpn*I.
- S/D-S/A:** *Bgl*II, *Eco*RI, *Kpn*I, *Sall*, *Sall*.
- GFP-pA:** *Sall*, *Bgl*II.
- SV40 pA:** *Sall*.
- bGH pA:** *Sall*.
- Bottom Row:** *Bgl*II, *Eco*RI, *Kpn*I.
- CMV:** *Bgl*II, *Eco*RI, *Kpn*I.
- S/D-S/A:** *Bgl*II, *Eco*RI, *Kpn*I.
- GFP-pA:** *Sall*, *Bgl*II.
- SV40 pA:** *Sall*.
- bGH pA:** *Bgl*II.

Diagram illustrating the construction of pTR-BG-UF. The process involves the recombination of pMC1Neo and pTR using T4 DNA ligase and SphI. The resulting recombinant vector, pTR-BG-UF, contains the T7 promoter, the polyA signal, and the polyA signal cassette. A pBS vector is also shown.

FIG. 2A-2

[E 2]

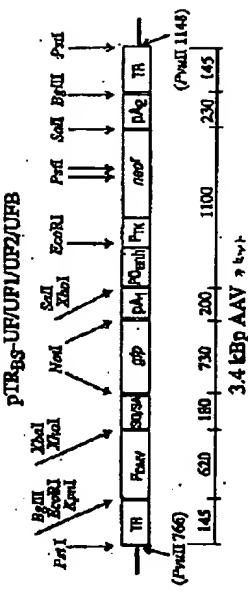


FIG. 2B-1

[E 2]

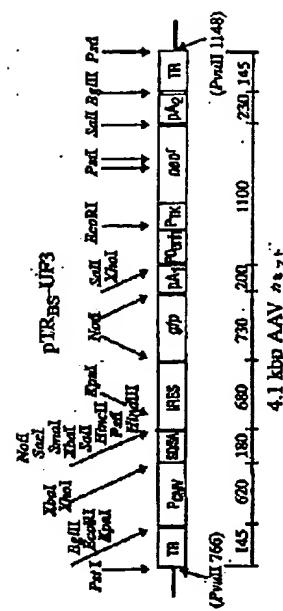


FIG. 2B-2

[E 2]

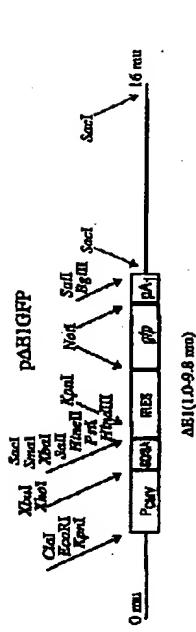


FIG. 2B-3

[E 3]

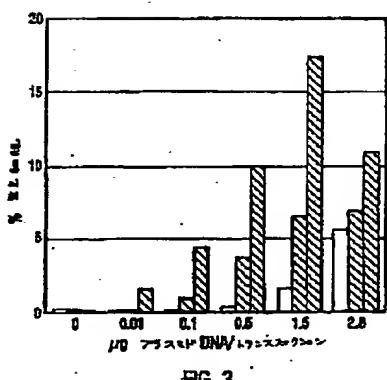


FIG. 3

(134)

FIG.4A

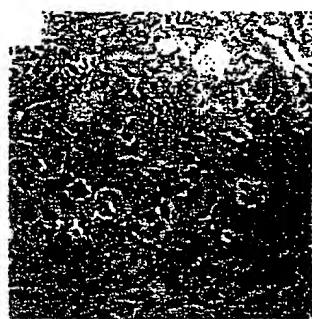
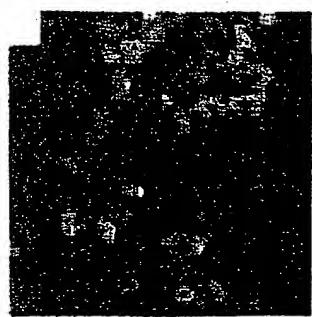


FIG.4B



(135)

FIG.5A

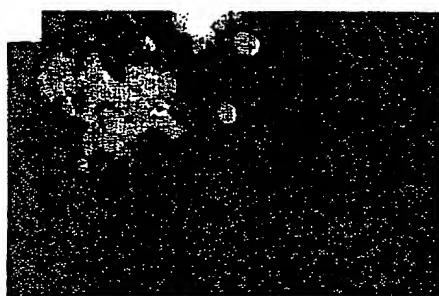


FIG.5B

(135)

FIG.5C



FIG.5D

(136)

FIG.6B

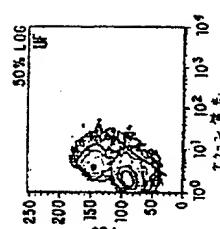
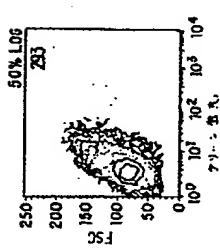


FIG.6A



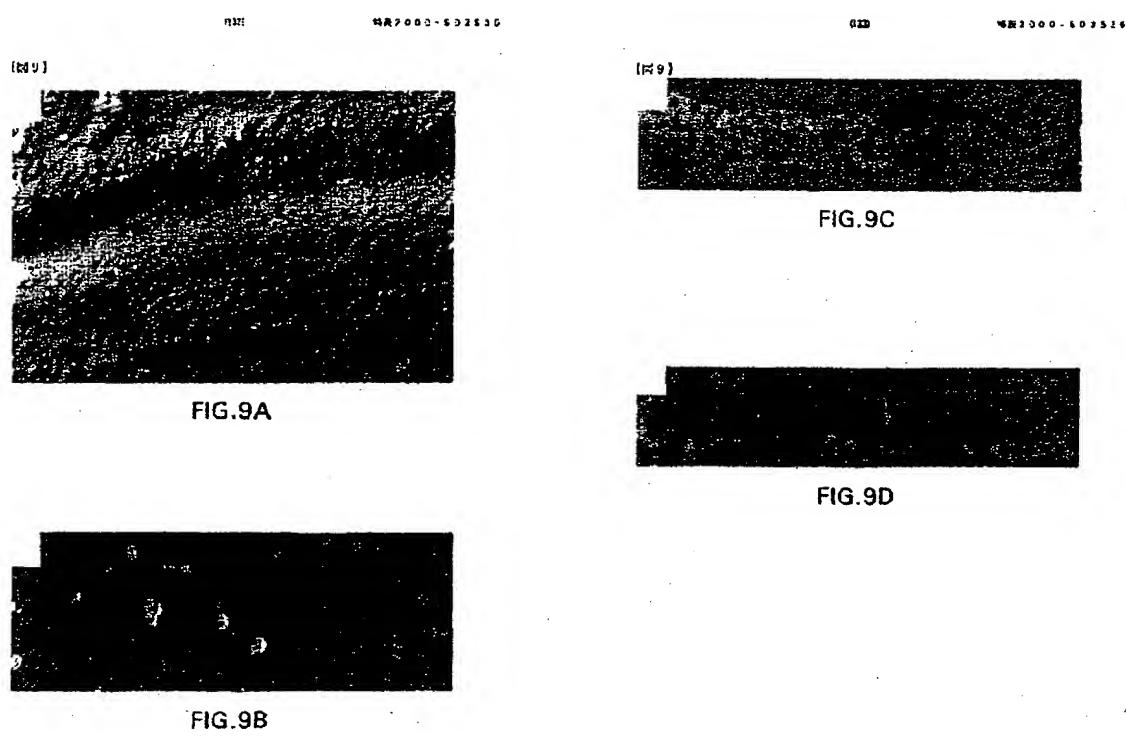
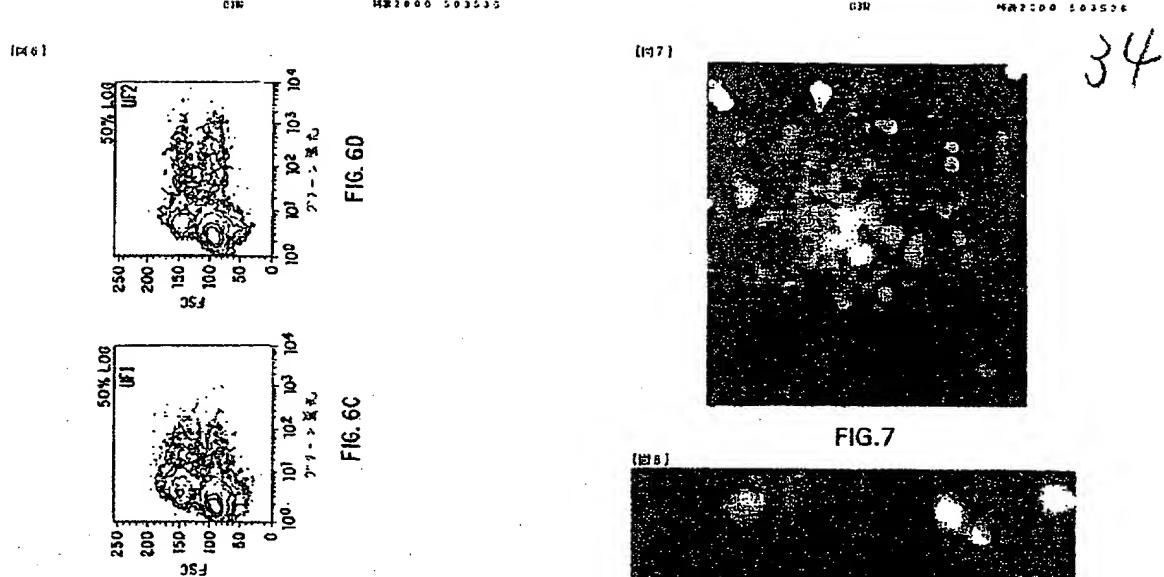


FIG. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Date and signature of
PL. (AS 10/00033)

Category	Classification according to the International Patent Classification	Information Annex
P, X	INTERFERON TECHNOLOGY 1971, 1976. EPO-212, 1976; 1977-0124. May 1976, "INTERFERON" LETT. P. ET AL: "Interferon" known for and used as a specific antiviral agent, especially to treat cancer. "Interferon" protein gives total human leukocyte 20%. See the whole document.	1-20 70-71 80 83-84 84-85 85-86 86-87 87-88
P, X	JOURNAL OF VETERINARY 70 (7), 1966. EPO-212, 1966; 1967-0124. July 1966, "INTERFERON" INTERFERON 5 ET AL: "A "normalised" protein "Interferon" material can be adapted for highly specific diseases. 14 immunotherapy cases." See the whole document.	1-20
P, X	INTERFERON, GROWTH, INC., CLEVELAND, 1979/80; 20112, 1979-01 CLEVELAND, 1979/80; 1980-0120. 14 August 1980, "INTERFERON" "Interferon" protein, "Interferon" protein "Interferon" is targeted to the plasma See the whole document.	1-20 70-71 80-81 81-82 82-83 83-84 84-85 85-86 86-87 87-88

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				P. WO/ Application No. PCT/US 37/000753	
Detailed description of the invention reported		Publication date	Priority date (including country)	Publication date	
NO 9507453 A		15-03-95	52 5623264 A 53 7795294 A 54 2153170 A 57 6151370 A	23-04-96 27-05-96 28-05-96 29-05-96	
NO 9621173 A		15-03-95	5005		

卷之三

GENE	PI	HO-1 (P50)
C12P 140	C12Q 170	
C12Q 160		Z
C12Q 160	G01N 13-05	M
G01N 140	C12N 170	B
NC12N 150	ZNA	
C12R 180		
SD12N	EPAT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE, OAISF, SJ, CF , CG, CI, CM, GA, GH, ML, MR, NE, SN, TD, TH, APNE, LS, MW, SD, S Z, UCI, UGAND, AE, BY, KG, KZ, MD , RU, TI, TMQ, AL, AM, AT, AU, AZ , BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, G E, RU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR , KZ, LC, LE, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MO, NZ, P , L, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK , TI, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN	
GB12N	シラカバ, ニコラス アメルカセイ, フロリダ 2000, グイ ンズビュ, エル グリジュー, ハティーヌ イチ ドライフ ハツ	
GB12N	キ-スワース, ワイアム ダブリュー- アメルカセイ, フロリダ 1000, グイ ンズビュ, エル グリジュー, ハティーヌ イチ, ストーリート 1000	

【物件名】

刊行物 1

【添付書類】

1/2 ページ

刊行物 1

Number = [AY004213]

LOCUS AY004213 **954 bp DNA linear** **SYN** 28-JUL-2000
DEFINITION Synthetic construct luciferase (cluc) gene, complete cds.
ACCESSION AY004213
VERSION AY004213.1
KEYWORDS
SOURCE *Renilla reniformis*
ORGANISM synthetic construct
artificial sequences.
REFERENCE 1 (bases 1 to 954)
AUTHORS Ferbitz, L., Deininger, W., Fuhrmann, M. and Hegemann, P.
TITLE A synthetic gene coding for *Renilla luciferase* is a versatile expression marker in green algae
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 954)
AUTHORS Ferbitz, L., Deininger, W., Fuhrmann, M. and Hegemann, P.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (04-JUL-2000) Institut fuer Biochemie, Universitaet Regensburg, Universitaetstr. 31, Regensburg 93040, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..954
/organism="synthetic construct"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:32630"
/focus
11..946
/organism="Renilla reniformis"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:6136"
source
gene 11..946
/gene="cluc"
CDS 11..946
/gene="cluc"
/EC_number="1.13.12.5"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="luciferase"
/protein_id="AAF93186.1"
/db_xref="GI:979244"
/translation="MASKVYDPEOKRKRIMTGPQWHRARCKOMNVILDSFINTYDSEKHA
NAVIFLHGNAASSYLMRHVVPHIEPVRCIIPDLMGKGSKGSNGSYRLLHDHYKYL
AWFELLNLPKKIIFVGHIDWACLAFLPHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESTDEMPDIE
EDIALIKSEEGEIKWLENFFVETMLPSKINRKLPEEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLS
WPREIPLVKGKGPDVQIVRVMYHAYLRSADOLPKIIFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPT
EFVKVKGLHFSQEDAPDIEKGKYIKSFVVERVLKNDT"
BASE COUNT 217 a 208 c 298 g 141 t
ORIGIN
1 gatactcgat atggcccgca egggtgtacga ccccgagccg cgcacggca tgatccacgg
61 ccctcgttgc tgggtctcgat gcaaggcgat gacgtgtcg gacagcttca tcaactacta
121 cgacagcgat aagcaccccg agaaacccgtt gatcttctcg caceggcaacg cggccacccg
181 ctaccgttgc cgccacgttg tgccccacat ccggcccggt gcccgcttca tcatcccgaa
241 ctgtatccgc atggccaaagag cggccaaacgc agcttacccgc tgctggacca
301 ctacaatgtac ctggccgcgt gtttccggat gtttccggat cccaaagaaga tcatcttctgt
361 ggccacccgc tggggggccct ccactccatc tacggccccc agggccaaat
421 caaggccatc gtgcacccgc agatccgtgtt ggcacgtata gagatccgtt acggatgtcc
481 cgacatccgc gaggccatccgc ccctgtatcaaa gggccggat gggccggat gggccggat
541 gaaacccatc ttgttggatc ccatgtccgtt cggccatccgc atccgttgcggcc
601 ggatgtccgc gcttacccgc agcccttcaaa ggatggccgc gaggttgcggcc gttccaccc
661 gagcttgcgtt cggccatccgc ccctgtatcaaa gggccggat gggccggat tccatgttgc
721 gggccatccgc aacgcgttccgc tgcgcggcccg ccacgttgc cccaaatgtt tcatccggat
781 ggacccggcc tttttccatccgc acggccatccgtt gggccggcc gggccggat tccatgttgc

841 gttcggtgaag gtgaagggcc tgcacttcag ccaggaggac gctcccgacg agatggccaa
901 gtacatcaag agcttgcgtgg agcgcgtgtc gaagaacgtt acgttaaggat cccg

//

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.